



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

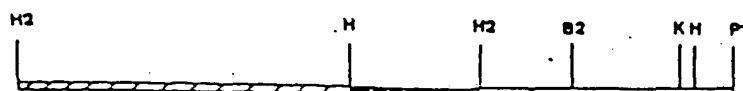
(51) Classification internationale des brevets <sup>4</sup> : C12N 15/00, 1/20, C12P 21/02 A01N 63/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 88/09812 (43) Date de publication internationale: 15 décembre 1988 (15.12.88)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00292</p> <p>(22) Date de dépôt international: 9 juin 1988 (09.06.88)</p> <p>(31) Numéros des demandes prioritaires: 87/08090 88401121.4 (EP)</p> <p>(32) Dates de priorité: 10 juin 1987 (10.06.87) 6 mai 1988 (06.05.88)</p> <p>(33) Pays de priorité: FR</p> <p>(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]: 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]: 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SANCHIS, Vincent [FR/FR]: 15, avenue Toulouse-Lautrec, F-78390 Bois-d'Arcy (FR). LERECLUS, Didier [FR/FR]: 16 bis, rue Lauriston, F-75116 Paris (FR). MENOU, Ghislaine [FR/FR];</p>			
<p>22, rue Rosenwald, F-75015 Paris (FR). LECADET, Marguerite-Marie [FR/FR]; 10, rue Nicolas-Charlet, F-75015 Paris (FR). MARTOURET, Daniel [FR/FR]: 6, square de l'Hôtel-de-Ville, F-78210 Saint-Cyr-l'Ecole (FR). DEDONDER, Raymond [FR/FR]: 3, allée des Pépinières, F-92290 Châtenay-Malabry (FR).</p> <p>(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud, 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: BJ (brevet OAPI), CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CM (brevet OAPI), GA (brevet OAPI), JP, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>			

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR POLYPEPTIDES EXERCISING A LARVICIDAL EFFECT IN LEPIDOPTERA

(54) Titre: SEQUENCES DE NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES DOTES D'UNE ACTIVITE LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERES

(57) Abstract

A nucleotide sequence coding for at least one part of the terminal N region of a <sup>PHT 671</sup> polypeptide which exercises a specific toxic effect on Lepidoptera of the Noctuidae family, preferably on *S.littoralis*, is characterized by its capacity for hybridisation with a gene capable of expressing a polypeptide exercising a toxic effect on *S.littoralis* larvae.



(57) Abrégé

L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de *S.littoralis*, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de *S.littoralis*.

DNA OF VECTOR	
— ADN du vecteur pUC9	B2 : <i>Bgl</i> II
DNA OF STRAIN	H : <i>Mind</i> II
— ADN de la souche <u>entomocidus</u> 601	H2 : <i>Hinc</i> II
DNA OF STRAIN	K : <i>Kpn</i> I
— ADN de la souche <u>sizawai</u> 7-29	P1 : <i>Pst</i> I

DEMANDE INTERNATIONALE  
SELON LE TRAITÉ  
DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS

REQUÊTE

LE SOUSSIGNÉ REQUIERT QUE LA PRÉSENTE DEMANDE INTERNATIONALE SOIT TRAITÉE CONFORMÉMENT AU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

(Cadre réservé à l'office récepteur)  
DEMANDE INTERNATIONALE N°:

DATE DU DÉPÔT  
INTERNATIONAL:

(Cachez)  
Nom de l'office récepteur et « Demande internationale PCT »

Cote du dossier du déposant ou du mandataire  
(indiquée par le déposant s'il le désire)

0645 A/1

Cadre N° I TITRE DE L'INVENTION

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES DOTES  
D'UNE ACTIVITÉ LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERES.

Cadre N° II DEPOSANT (QU'IL SOIT OU NON ÉGALEMENT INVENTEUR): ETATS DESIGNÉS POUR LESQUELS IL EST DÉPOSANT. Utiliser le présent cadre pour indiquer le déposant ou, s'il y en a plusieurs, l'un d'entre eux. S'il y a plus d'une personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale), continuer dans le cadre N° III.

La personne indiquée dans le présent cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement

Nom et adresse:\*\*

INSTITUT PASTEUR  
25-28 rue du Dr. Roux  
75724 PARIS CEDEX 15 (France)

Numéro de téléphone:  
(préciser l'indicatif)

Adresse télégraphique:

Adresse de télécopieur:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile\*\*\*

FRANCE

FRANCE

La personne indiquée dans le présent cadre est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés

tous les Etats désignés sauf

les Etats-Unis d'Amérique

les Etats-Unis

d'Amérique seulement

les Etats indiqués dans

le "Cadre supplémentaire"

Cadre N° III AUTRES DÉPOSANTS, LE CAS ÉCHÉANT; (AUTRES) INVENTEURS, LE CAS ÉCHÉANT: ETATS DESIGNÉS POUR LESQUELS ILS SONT DÉPOSANTS (LE CAS ÉCHÉANT). Il convient de remplir un sous-cadre pour chaque personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale). Si les deux sous-cadres ci-après ne suffisent pas, continuer dans le "Cadre annexe". (en donnant pour chaque personne supplémentaire les mêmes indications que dans les deux sous-cadres ci-après) ou utiliser une "feuille annexe".

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement

Nom et adresse:\*\*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
147 rue de l'Université  
75341 PARIS CEDEX 07 (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

FRANCE

Pays du domicile\*\*\*

FRANCE

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés

tous les Etats désignés sauf

les Etats-Unis d'Amérique

les Etats-Unis

d'Amérique seulement

les Etats indiqués dans

le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):

déposant et inventeur\*

déposant seulement

inventeur seulement

Nom et adresse:\*\*

SANCHIS Vincent  
15 avenue Toulouse Lautrec  
78390 BOIS D'ARCY (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

FRANCE

Pays du domicile\*\*\*

FRANCE

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés

tous les Etats désignés sauf

les Etats-Unis d'Amérique

les Etats-Unis

d'Amérique seulement

les Etats indiqués dans

le "Cadre supplémentaire"

\* Si la personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou comme "inventeur seulement" n'est pas un inventeur pour tous les Etats désignés, donner les indications nécessaires dans le "Cadre annexe".

\*\* Indiquer le nom d'une personne physique en donnant son nom de famille, immédiatement suivi du (des) prénoms. Indiquer le nom d'une personne morale en donnant sa désignation officielle complète. Inclure dans l'adresse à la fois le code postal (le cas échéant) et le pays (nom).

\*\*\* Faute d'indication du domicile, il sera supposé que le pays du domicile est le même que le pays indiqué dans l'adresse.

Cadre N° III SUITE (S'IL EST NÉCESSAIRE) AUTRES DÉPOSANTS, LE CADRE CAS ÉCHEANT; ETAT DES DÉPOSANTS POUR LESQUELS ILS SONT DÉPOSANTS (AUTRES) INVENTEURS, LE CAS ÉCHEANT. (LE CAS ÉCHEANT). Il convient de remplir un sous-cadre pour chaque personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale).

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case).  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement

Nom et adresse:\*\*

LERECLUS Didier  
16 bis rue Lauriston  
75116 PARIS (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: **FRANCE**

Pays du domicile:\*\*\*

**FRANCE**

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés  tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique  les Etats-Unis d'Amérique seulement  les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement\*

Nom et adresse:\*\*

MENOU Ghislaine  
22 rue Rosenwald  
75015 PARIS (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: **FRANCE**

Pays du domicile:\*\*\*

**FRANCE**

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés  tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique  les Etats-Unis d'Amérique seulement  les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement\*

Nom et adresse:\*\*

LECADET Marguerite-Marie  
10 rue Nicolas Charlet  
75015 PARIS (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

**FRANCE**

Pays du domicile:\*\*\*

**FRANCE**

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés  tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique  les Etats-Unis d'Amérique seulement  les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement\*

Nom et adresse:\*\*

MARTOURET Daniel  
6 Square de l'Hôtel de Ville  
78210 SAINT-CYR-L'ECOLE (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: **FRANCE**

Pays du domicile:\*\*\*

**FRANCE**

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés  tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique  les Etats-Unis d'Amérique seulement  les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

- Si la personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou comme "inventeur seulement" n'est pas un inventeur pour tous les Etats désignés, donner les indications nécessaires dans le "Cadre annexe".
- Indiquer le nom d'une personne physique en donnant son nom de famille, immédiatement suivi du (des) prénoms. Indiquer le nom d'une personne morale en donnant sa désignation officielle complète. Inclure dans l'adresse à la fois le code postal (le cas échéant) et le pays (nom).
- Faute d'indication du domicile, il sera supposé que le pays du domicile est le même que le pays indiqué dans l'adresse.

Si cette feuille annexe n'est pas utilisée, il n'est pas nécessaire de l'inclure dans la requête.

Cadre N° III SUITE (S'AGISSE D'ESSAIRE) AUTRES DÉPOSANTS, LE CADRE CAS ÉCHEANT, ETAT, DÉPOSANTS POUR LESQUELS ILS SONT DÉPOSANT (AUTRES) INVENTEURS, LE CAS ÉCHEANT; ETAT, DÉPOSANT (AUTRES) INVENTEURS, LE CAS ÉCHEANT. Il convient de remplir un sous-cadre pour chaque personne (celle-ci peut éventuellement être une personne morale).

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement\*

Nom et adresse:\*\*

DEDONDER Raymond  
3 allée des Pépinières  
92290 CHATENAY-MALABRY (France)

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité: **FRANCE**

Pays du domicile:\*\*\*

**FRANCE**

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

les Etats-Unis d'Amérique seulement

les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement\*

Nom et adresse:\*\*

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile:\*\*\*

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

les Etats-Unis d'Amérique seulement

les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement\*

Nom et adresse:\*\*

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile:\*\*\*

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

les Etats-Unis d'Amérique seulement

les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

La personne indiquée dans ce sous-cadre est (cocher une seule case):  déposant et inventeur\*  déposant seulement  inventeur seulement\*

Nom et adresse:\*\*

Si la personne indiquée dans le présent sous-cadre est déposant (ou à la fois déposant et inventeur) préciser également:

Pays de la nationalité:

Pays du domicile:\*\*\*

et si elle est déposant (cocher une seule case) pour:

tous les Etats désignés

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

les Etats-Unis d'Amérique seulement

les Etats indiqués dans le "Cadre supplémentaire"

\* Si la personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou comme "inventeur seulement" n'est pas un inventeur pour tous les Etats désignés, donner les indications nécessaires dans le "Cadre annexe".

\*\* Indiquer le nom d'une personne physique en donnant son nom de famille, immédiatement suivi du (des) prénoms. Indiquer le nom d'une personne morale en donnant sa désignation officielle complète. Inclure dans l'adresse à la fois le code postal (le cas échéant) et le pays (nom).

\*\*\* Faute d'indication du domicile, il sera supposé que le pays du domicile est le même que le pays indiqué dans l'adresse.

Si cette feuille annexe n'est pas utilisée, il n'est pas nécessaire de l'inclure dans la requête.

Cadre N° IV MANDATAIRE (LE CAS ECHEANT) OU REPRESENTANT (LE CAS ECHEANT): ADRESSE POUR LES NOTIFICATIONS (DANS CERTAINS CAS). Un représentant ne peut être nommé que s'il y a plusieurs déposants et si aucun mandataire n'est ou n'a été nommé, le représentant commun doit être l'un des déposants. La personne suivante (celle-ci peut éventuellement être une personne morale) est/ a été nommée comme mandataire ou comme représentant commun pour agir au nom du/des déposant(s) auprès des autorités internationales compétentes:

Nom et adresse, comprenant le code postal et le pays:

S.C. ERNEST GUTMANN YVES PLASSERAUD  
67 boulevard Haussmann  
75008 PARIS (FRANCE)

PEAUCELLE Chantal

Si l'espace ci-dessus est insuffisant pour indiquer une adresse pour des notifications, cocher ici

Numéro de téléphone: 47.42.82.82 Adresse 280210F

(préciser l'indicatif) (télégraphique)

Adresse de télécopieur:

Cadre N° V DESIGNATION DE GROUPES D'ETATS OU D'ETATS<sup>1)</sup>; CHOIX DE CERTAINES FORMES DE PROTECTION OU DE TRAITEMENT. Les désignations suivantes sont faites (cocher les cases appropriées):

Brevet régional

EP Brevet européen<sup>2)</sup>: AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, DE Allemagne (République fédérale d'), FR France, GB Royaume-Uni, IT Italie, LU Luxembourg, NL Pays-Bas, SE Suède, et tout autre Etat contractant de la Convention sur le brevet européen qui est devenu partie au PCT après la publication de la présente feuille (préciser sur la ligne pointillée):

OA Brevet OAPI: Bénin, Cameroun, Congo, Gabon, Mali, Mauritanie, République centrafricaine, Sénégal, Tchad, Togo et tout autre Etat membre de l'OAPI qui est devenu partie au PCT après la publication de la présente feuille; si un autre titre de l'OAPI est désiré, le préciser sur la ligne pointillée<sup>3)</sup>:

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est désirée, la préciser sur la ligne pointillée<sup>3)</sup>):

<input type="checkbox"/> AT Autriche <sup>3)</sup> .....	<input type="checkbox"/> KR République de Corée <sup>3)</sup> .....
<input type="checkbox"/> AU Australie <sup>3)</sup> .....	<input type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....
<input type="checkbox"/> BB Barbade .....	<input type="checkbox"/> LU Luxembourg <sup>3)</sup> .....
<input type="checkbox"/> BG Bulgarie <sup>3)</sup> .....	<input type="checkbox"/> MC Monaco <sup>3)</sup> .....
<input type="checkbox"/> BR Brésil <sup>3)</sup> .....	<input type="checkbox"/> MG Madagascar .....
<input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein .....	<input type="checkbox"/> MW Malawi <sup>3)</sup> .....
<input type="checkbox"/> DE Allemagne (République fédérale d') <sup>3)</sup> .....	<input type="checkbox"/> NL Pays-Bas .....
<input type="checkbox"/> DK Danemark .....	<input type="checkbox"/> NO Norvège .....
<input type="checkbox"/> FI Finlande .....	<input type="checkbox"/> RO Roumanie .....
<input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni .....	<input type="checkbox"/> SD Soudan .....
<input type="checkbox"/> HU Hongrie .....	<input type="checkbox"/> SE Suède .....
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japon <sup>3)</sup> .....	<input type="checkbox"/> SU Union soviétique <sup>3)</sup> .....
<input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée <sup>3)</sup> .....	<input checked="" type="checkbox"/> US Etats-Unis d'Amérique <sup>3)</sup> .....

Espace réservé pour désigner des Etats (aux fins d'un brevet national) qui sont devenues parties au PCT après la publication de la présente feuille:

1) L'ordre des désignations choisi par le déposant peut être indiqué en marquant dans les cases des numéros d'ordre en chiffres arabes (voir également les notes relatives au cadre N° V).

2) La sélection d'Etats particuliers pour un brevet européen peut être faite lors de l'ouverture de la phase nationale (régionale) devant l'Office européen des brevets (voir également les notes relatives au cadre N° V).

3) Si une autre forme de protection ou un titre additionnel ou, aux Etats-Unis d'Amérique, un traitement à titre de "continuation" ou de "continuation-in-part" est désiré, le préciser conformément aux instructions données dans les notes relatives au cadre N° V.

## Cadre N° VI REVENDEURS DE PRIORITÉ (LE CAS ÉCHÉANT) La partie 1 des demande(s) antérieure(s) suivante(s) est revendiquée

Pays (s'il s'agit d'une demande nationale, pays où elle a été déposée; s'il s'agit d'une demande régionale ou internationale, l'un des pays pour lesquels elle a été déposée)	Date de dépôt (jour, mois, année)	Demande N°	Office de dépôt (ne remplir que si la demande antérieure est une demande internationale ou une demande régionale)
1) FRANCE	10/06/1987	87 08090	
2) BREVET EUROPEEN (FRANCE)	06/05/1988	88.401121.4	FRANCE
3)			

(On peut utiliser un code littéral pour indiquer le pays et/ou l'office de dépôt)

Lorsque la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur, le déposant peut, contre paiement de la taxe requise, demander ce qui suit:

L'office récepteur est prié de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la demande antérieure/des demandes antérieures identifiées ci-dessus par des numéros (indiquer les numéros) .....

## Cadre N° VII RECHERCHE ANTÉRIEURE (LE CAS ÉCHÉANT): Remplir si une recherche (internationale, de type international ou autre) a déjà été demandée (ou effectuée) à l'administration chargée de la recherche internationale et si ladite administration est maintenant prête de fonder la recherche internationale, dans la mesure du possible, sur les résultats de ladite recherche antérieure. Prière de l'identifier en se référant à la demande pertinente (ou à sa traduction) ou à la demande de recherche.

Numéro de la demande internationale ou pays et numéro (ou office régional) d'une autre demande.

Date de dépôt international/régional/national:

10 juin 1987

87 08090 Date de la demande de recherche.

Numéro attribué à la demande de recherche (s'il est connu):

10 juin 1987

FA 398768

## Cadre N° VIII SIGNATURE DU/DES DÉPOSANT(S) OU DU MANDATAIRE



PEAUCELLE Chantal

Si le présent formulaire de requête est signé par un mandataire au nom d'un déposant, un pouvoir séparé, nommant le mandataire et signé par le déposant, est requis. Si l'on désire, dans ce cas, utiliser un pouvoir général (déposé auprès de l'office récepteur), une copie de ce dernier doit accompagner ce formulaire.

## Cadre N° IX BORDEREAU (à remplir par le déposant)

La présente demande internationale comprend le nombre de feuilles suivant:

1 requête	6	feuilles
2 description	43	feuilles
3 revendications	16	feuilles
4 abrégé	1	feuilles
5 dessins	5	feuilles
Total	71	feuilles

La figure numero ..... des dessins (le cas échéant) est proposée pour accompagner l'abrégé lors de la publication.

La présente demande internationale est accompagnée, telle que déposée, des pièces identifiées ci-dessous:

- pouvoir séparé signé
- copie du pouvoir général
- document(s) de priorité (voir le cadre N° VI)
- reçu ou timbres fiscaux pour les taxes payées
- chèque de paiement des taxes
- demande de débit de compte courant
- autre document (spécifier) **Rapport de Recherche**

(Ce qui suit est à remplir par l'office récepteur)

1. Date effective de réception de la prétendue demande internationale:

2. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant la prétendue demande internationale:

3. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11 du PCT:

4. Dessins  reçus  pas de dessins

(Ce qui suit est à remplir par le Bureau international)

Date de réception de l'exemplaire original:

## Cadre annexe. Utiliser le cadre dans les cas suivants

ii. si plus de trois personnes sont en cause comme déposants et/ou inventeurs; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° III" et fournir pour chaque personne supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre N° III;

iii. si, dans le cadre N° II ou dans les sous-cadres du cadre N° III, la case "les Etats désignés indiqués dans le 'cadre annexe'" est cochée, dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° II" ou "Suite du cadre N° III" ou "Suite des cadres N° II et III" (selon le cas), indiquer le nom du/des déposant(s) en cause et, à côté de chaque nom, le/les pays (ou EP ou OA, le cas échéant) pour lesquels la personne mentionnée est déposant;

iv. Si, dans le cadre N° II ou l'un des sous-cadres du cadre N° III, une personne indiquée comme "déposant et inventeur" ou "inventeur seul(e)" n'est pas inventeur pour tous les Etats désignés ou pour les Etats-Unis d'Amérique; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° II" ou "Suite du cadre N° III" ou "Suite des cadres N° II et III" (selon le cas), indiquer le nom de l'inventeur et, à côté de ce nom, le/les pays (ou EP ou OA, le cas échéant) pour lesquels la personne mentionnée est inventeur;

v. si il y a plusieurs mandataires ayant des adresses différentes; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° IV" et fournir pour chaque mandataire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre N° IV;

vi. si, dans le cadre N° V, le nom d'un pays (ou de l'OAPI) est accompagné de la mention "brevet d'addition", "certificat d'addition" ou "certificat d'auteur d'invention additionnel" ou si, dans le cadre N° V, le nom des Etats-Unis d'Amérique est accompagné de la mention "Continuation" ou "Continuation-in-part"; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° V" et inscrire le nom de chaque pays en cause (ou de l'OAPI) en précisant après le nom le numéro du titre principal ou de la demande principale ainsi que la date de délivrance du titre principal ou de dépôt de la demande principale;

vii. si la priorité de plus de trois demandes antérieures est revendiquée; dans ce cas, indiquer "Suite du cadre N° VI" et fournir pour chaque demande antérieure supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre N° VI;

viii. si l'un des cadres ne suffit pas à contenir tous les renseignements; dans ce cas, écrire "Suite du cadre N° ... " [indiquer le numéro du cadre] et fournir les renseignements conformément aux instructions données dans le cadre dans lequel la place était insuffisante.

ix. si le déposant a l'intention de revendiquer, à l'égard de tout office désigné, le bénéfice de dispositions de la législation nationale concernant des divulgations non opposables ou des exceptions au défaut de nouveauté; dans ce cas, écrire "Déclaration concernant des divulgations non opposables ou des exceptions au défaut de nouveauté" et fournir ci-dessous cette déclaration.

## Suite cadre n° IV "AUTRES MANDATAIRES" :

GUTMANN Ernest  
 PLASSERAUD Yves  
 GROSSET-FOURNIER Chantal

Europäisches  
Patentamt

Generaldirektion 2

Europäische Patent  
Offizin

Directorate-General 2

Office européen  
des brevets

Direction générale 2

Erhardtstraße 27  
D-8000 München 2

Telex 523656 epmu d

CHAPITRE II

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

REÇU LE 11.07.1988

CG45AA

10

Lettre recommandée

S.C. Ernest Gutmann  
Yves Plasseraud  
67, Boulevard Haussmann

F-75003 PARIS

FRANCE

Inscrire les NOM et ADRESSE du MANDATAIRE  
ou, à défaut, du DEPOSANT

EXPEDITEUR: L'ADMINISTRATION CHARGEÉE DE L'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU RAPPORT  
D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL  
émise conformément à la règle 71.1. du PCT

DATE D'EXPÉDITION par l'administration  
chargée de l'examen préliminaire international

COTE DU DOSSIER DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE

0645.3

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE

Demande internationale No

Date du dépôt international

PCT/FR 88/00292

09.06.1988

Déposant (Nom)

Institut Pasteur et al.

NOTIFICATION

Par la présente il est notifié au déposant que la présente administration chargée de l'examen préliminaire international transmet ci-joint le rapport d'examen préliminaire international, et ses annexes, le cas échéant, établi(s) pour la demande internationale identifiée ci-dessus.

L'attention du déposant est attirée sur le rappel contenu dans le formulaire PCT/IB/332, qu'il a reçu du Bureau international, concernant les délais dans lesquels il doit accomplir certains actes devant chaque office élu.

Une copie du rapport, accompagnée des annexes s'y rapportant, a été expédiée, ce jour même, au Bureau international.

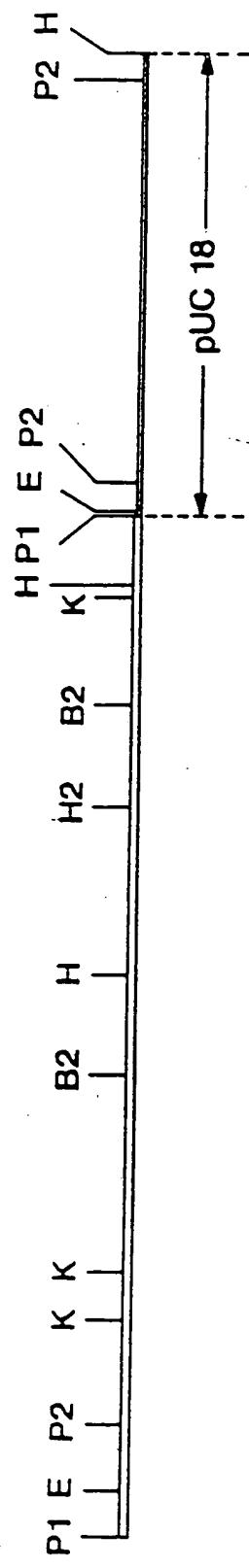
L'ADMINISTRATION CHARGEÉE DE L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Nom et adresse postale

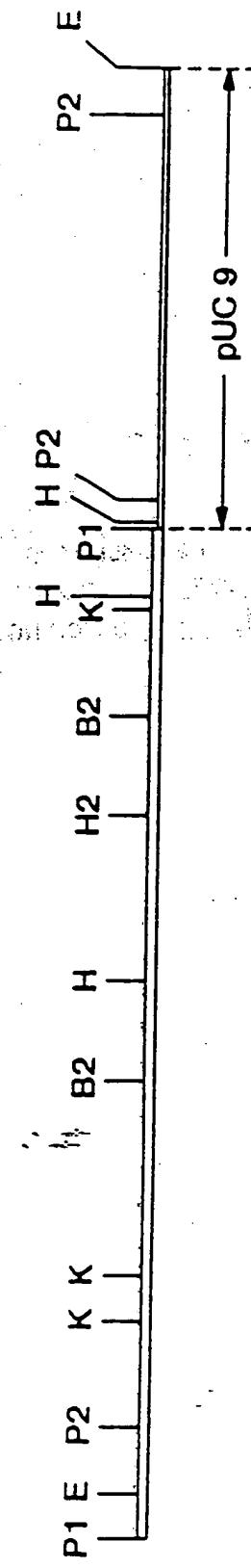
Fonctionnaire autorisé

Office européen des brevets

pHTA 6



pHTE 6



B2 : Bgl II

E : Eco RI

H2 : Hinc II

H : Hind III

K : Kpn I

P1 : Pst I

P2 : Pvu II

1 Kb

FIG. 1

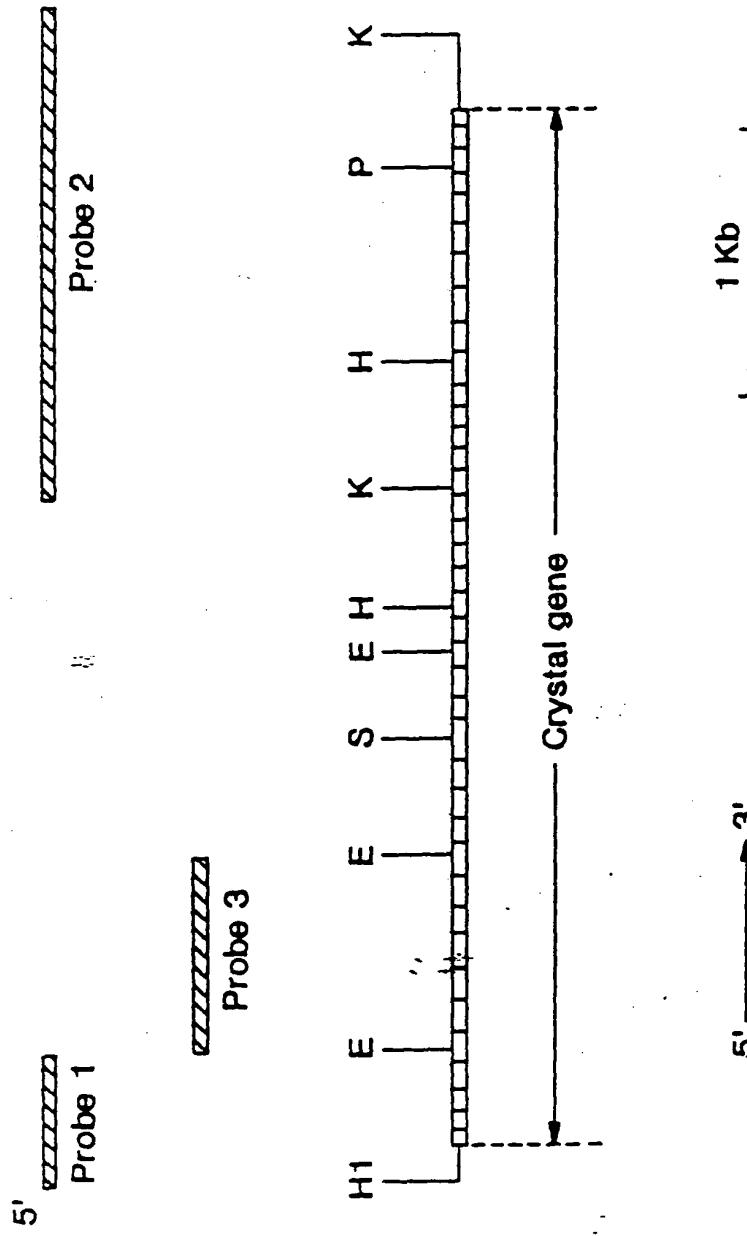
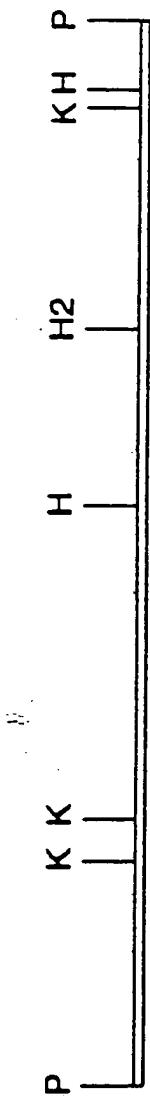


FIG. 2



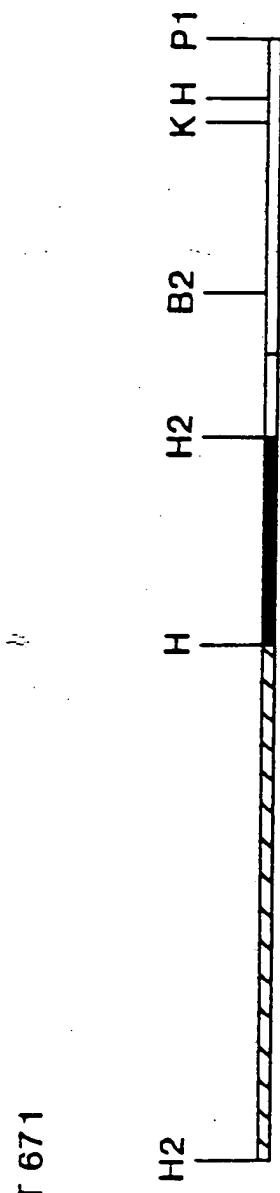
Probe 1

Probe 2

Probe 3

FIG. 3

pHT 671



## DNA of the vector pUC9

B2 : B91

DNA of the strain entomocidua 601

H : Hind III

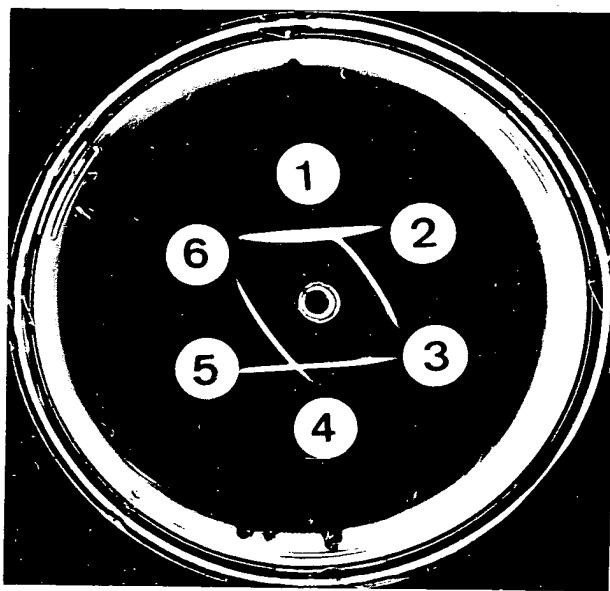
## H2 : Hinc //

$\kappa : \mathrm{Kpn} \mathrm{I}$

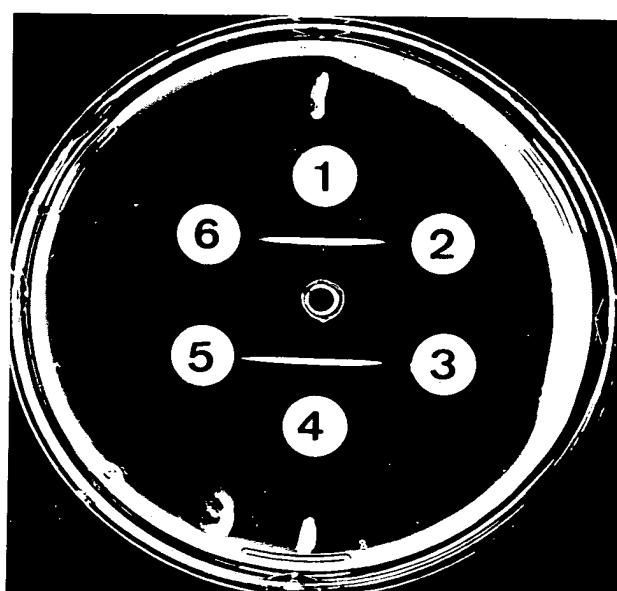
P1 : Pst 1

FIG. 4

1 Kb



**FIG. 5A**



**FIG. 5B**

VERIFICATION OF A TRANSLATION  
(VERIFICATION D'UNE TRADUCTION)

I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below :

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application n° PCT/FR 8800292 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true ; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date - December 4, 1989

Full name of the translator ..... JARYS.....DÉRÉ.....  
(Nom et prénom du traducteur)

Signature of the translator..... Denk. Jany.....  
(Signature du traducteur)

Post Office Address (Adresse postale) ... 7 rue d'UFSAL  
... 6700 STRASBURES....

*filed  
12/11/89*

**TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS**  
**RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

<b>IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE</b>		Code du dossier du déposant ou du mandataire																				
		0645 B																				
Demande internationale N°	Date de dépôt international																					
PCT/FR88/00 292	09.06.1988																					
Office récepteur	Date de priorité revendiquée																					
RO / FR	10.06.1987																					
<b>Déposant (Nom)</b>																						
INSTITUT PASTEUR ET AL																						
<b>BASE DU RAPPORT</b>																						
<p>1. MODIFICATIONS ET/OU RECTIFICATIONS<sup>1</sup> — Les modifications et/ou les rectifications faites auprès de la présente administration chargée de l'examen préliminaire international concernant les revendications, la description et/ou les dessins de la demande internationale identifiée ci-dessus sont annexées à ce rapport.</p> <p>a. <input type="checkbox"/> Le présent rapport a été établi sur la base des documents de demande suivants:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> les documents de la demande tels que déposés</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;"><input type="checkbox"/> description, pages</td> <td style="width: 70%; padding: 5px;">telle que déposée à l'origine</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> description, pages</td> <td style="padding: 5px;">déposée par votre lettre du</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> description, pages</td> <td style="padding: 5px;">déposée par votre lettre du</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> description, pages</td> <td style="padding: 5px;">déposée par votre lettre du</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> revendication(s)</td> <td style="padding: 5px;">telle(s) que déposée(s) à l'origine</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> revendication(s)</td> <td style="padding: 5px;">déposée(s) par votre lettre du</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> revendication(s)</td> <td style="padding: 5px;">déposée(s) par votre lettre du</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> revendication(s)</td> <td style="padding: 5px;">déposée(s) par votre lettre du</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> dessins, feuille(s) fig.</td> <td style="padding: 5px;">tels que déposés à l'origine</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><input type="checkbox"/> dessins, feuille(s) fig.</td> <td style="padding: 5px;">déposés par votre lettre du</td> </tr> </table> <p>b. <input type="checkbox"/> Les modifications ont entraîné la suppression des feuilles suivantes: .....</p> <p>c. <input type="checkbox"/> Le présent rapport a été établi comme si les modifications mentionnées sur la feuille complémentaire n'avaient pas été faites, étant donné que, pour les raisons indiquées, elles ont été considérées comme allant au-delà de l'expédié de l'invention tel que déposé.</p>			<input type="checkbox"/> description, pages	telle que déposée à l'origine	<input type="checkbox"/> description, pages	déposée par votre lettre du	<input type="checkbox"/> description, pages	déposée par votre lettre du	<input type="checkbox"/> description, pages	déposée par votre lettre du	<input type="checkbox"/> revendication(s)	telle(s) que déposée(s) à l'origine	<input type="checkbox"/> revendication(s)	déposée(s) par votre lettre du	<input type="checkbox"/> revendication(s)	déposée(s) par votre lettre du	<input type="checkbox"/> revendication(s)	déposée(s) par votre lettre du	<input type="checkbox"/> dessins, feuille(s) fig.	tels que déposés à l'origine	<input type="checkbox"/> dessins, feuille(s) fig.	déposés par votre lettre du
<input type="checkbox"/> description, pages	telle que déposée à l'origine																					
<input type="checkbox"/> description, pages	déposée par votre lettre du																					
<input type="checkbox"/> description, pages	déposée par votre lettre du																					
<input type="checkbox"/> description, pages	déposée par votre lettre du																					
<input type="checkbox"/> revendication(s)	telle(s) que déposée(s) à l'origine																					
<input type="checkbox"/> revendication(s)	déposée(s) par votre lettre du																					
<input type="checkbox"/> revendication(s)	déposée(s) par votre lettre du																					
<input type="checkbox"/> revendication(s)	déposée(s) par votre lettre du																					
<input type="checkbox"/> dessins, feuille(s) fig.	tels que déposés à l'origine																					
<input type="checkbox"/> dessins, feuille(s) fig.	déposés par votre lettre du																					
<p>2. PRIORITÉ<sup>2</sup></p> <p>a. Le présent rapport a été établi comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait de la non-remise dans les délais les documents suivants:</p> <p><input type="checkbox"/> une copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.</p> <p><input type="checkbox"/> une traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> Le présent rapport a été établi comme si aucune priorité n'avait été revendiquée du fait que la revendication de priorité a été estimée non valable.</p> <p>Par suite, pour les besoins de ce rapport, la date de dépôt international indiquée ci-dessus est considérée comme étant la date pertinente.</p>																						
<p>* Lorsque des feuilles de remplacement sont annexées au présent rapport, une traduction de ces feuilles de remplacement doit être fournie aux offices étrangers dans le délai applicable selon l'article 39.1) du PCT.</p>																						

**INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES (Suite de la première feuille)**

## BASE DU RAPPORT (Suite)

3. UNITÉ DE L'INVENTION<sup>3</sup> — La demande internationale ne satisfait pas à l'exigence d'unité de l'invention.

a. En réponse à une invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant:

- a limité les revendications.
- a payé des taxes additionnelles.
- a payé des taxes additionnelles sous réserve. Lorsque le déposant le demande, le texte des réserves ainsi que la décision prise à ce sujet sont joints à ce rapport.
- n'a ni limité les revendications, ni payé de taxes additionnelles.

b.  Il n'a pas été envoyé d'invitation. L'avis de la présente administration chargée de l'examen préliminaire international est que la demande internationale ne satisfait pas aux exigences d'unité de l'invention, pour les motifs suivants. (préciser)

c. Par suite, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet de l'examen préliminaire international pour l'établissement de ce rapport:

- l'ensemble de la demande.
- les parties de la demande relatives aux revendications limitées, à savoir les revendications N°                  .
- les parties relatives à l'invention principale, à savoir les revendications N°                  .

4. NON-ÉTABLISSEMENT DU RAPPORT SUR LES QUESTIONS DE NOUVEAUTÉ, D'ACTIVITÉ INVENTIVE OU D'APPLICATION INDUSTRIELLE<sup>4</sup>

Les questions de savoir si l'invention revendiquée se révèle nouvelle, présente une activité inventive et s'avère susceptible d'application industrielle n'ont pas été abordées pour les motifs indiqués et en ce qui concerne:

a.  toute la demande internationale

b.  les revendications N°1-13, 15-19, 21-36

pour les motifs suivants: voir page jointe

L'adite demande internationale ou lesdites revendications N°                   sont relatives à l'objet suivant à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen. (préciser)

La description, les revendications ou les dessins (en indiquer les éléments) ou les revendications N°                   ne sont pas claires de sorte qu'une opinion valable ne peut être formée.

Les revendications ou les revendications N°                   ne se fondent pas de façon adéquate sur la description de sorte qu'une opinion valable ne peut être formée.

Les revendications N°                   sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément à la deuxième et à la troisième phrases de la règle 6.4.a) du PCT.

## CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs systèmes de classification s'appliquent, les indiquer tous):

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et selon la CIB

C12N 15/00 ; C12N 1/20 ; C12P 21/02 ; A01N 63/00

**DÉCLARATION MOTIVÉE QUANT AUX REVENDICATIONS SATISFAISANT AUX CRITÈRES DE NOUVEAUTÉ (N),  
D'ACTIVITÉ INVENTIVE (I), D'APPLICATION INDUSTRIELLE (A);  
CITATION DES DOCUMENTS ET EXPLICATIONS ÉTAYANT LA DÉCLARATION**

NUMÉRO DE REVENDICATION	DÉCLARATION (CRITÈRES)	CITATIONS DES DOCUMENTS ET EXPLICATIONS
14,20 N	AI: oui IA	Les séquences spécifiques selon la Revendication 14 et les polypeptides correspondants selon la Revendication 20 sont nouveaux (Article 33(2) PCT), et la détermination desdites séquences ne découle pas d'une manière évidente de l'état de la technique (Article 33(3) PCT).

## DIVULGATIONS NON ÉCRITES \*

Type de divulgation non écrite	Date de la divulgation écrite qui se réfère à la divulgation non écrite	Date de la divulgation non écrite

## MENTION DE CERTAINS DOCUMENTS PUBLIÉS \*\*

Demande/brevet	Date de publication	Date de dépôt	Date de priorité (éventuellement revendiquée)
EP-A-0 228 838	15.07.1987	09.12.1986	12.12.1985 05.09.1985

## MENTION DE CERTAINES IRRÉGULARITÉS DANS LA DEMANDE INTERNATIONALE \*\*\*

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu, ont été constatées:

## MENTION DE CERTAINES OBSERVATIONS RELATIVES À LA DEMANDE INTERNATIONALE \*\*\*

Les observations suivantes ont été indiquées en ce qui concerne la clarté des revendications, de la description et des dessins ou la question de savoir si les revendications se basent entièrement sur la description.

Voir pages jointes

## CERTIFICAT N

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international	Date d'achèvement du rapport d'examen préliminaire International 24.03.83
27.12.1988	
Administration chargée de l'examen préliminaire international O.E.B.	Signature du fonctionnaire autorisé R. Großkopf

## NOTES RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/IPEA/409

Ces notes sont destinées à faciliter l'utilisation du présent formulaire. Pour plus de renseignements, se référer au texte du Traité de coopération en matière de brevets et aux textes du règlement d'exécution et des instructions administratives de ce traité. En cas de divergence entre ces notes et lesdits textes, ce sont ces derniers qui s'appliquent. On entend par «article» les articles du traité par «règle» les règles du règlement d'exécution et par «instruction» les instructions administratives.

1 «Si les revendications ont été modifiées, le rapport est établi sur la base des revendications telles que modifiées.» (règle 70.2.a))  
 «Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international considère qu'une modification va au-delà de l'exposé de l'invention figurant dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée, le rapport est établi comme si cette modification n'avait pas été faite, et le rapport l'indique. Il indique également les raisons pour lesquelles ladite administration considère que la modification va au-delà dudit exposé.» (règle 70.2.c))

«Il est indiqué dans le rapport si des modifications ont été faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international. Lorsqu'une modification a abouti à la suppression d'une feuille entière, le fait est aussi précisé dans le rapport.» (règle 70.11)

«Si les revendications, la description ou les dessins ont été modifiés auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, chaque feuille de remplacement visée à la règle 66.8.a) est annexée au rapport. Les feuilles de remplacement auxquelles d'autres feuilles de remplacement ont été substituées ultérieurement et les lettres visées à la règle 66.8.a) ne sont pas annexées.» (règle 70.16)

2 «Si, conformément à la règle 66.7.a) cu b), le rapport est établi comme si la priorité n'avait pas été revendiquée, le rapport doit le préciser.» (règle 70.2.b))

«Si une copie de la demande dont la priorité est revendiquée dans la demande internationale est nécessaire à l'administration chargée de l'examen préliminaire international, le Bureau international la lui communiquera à bref délai, sur requête. Si cette copie n'est pas remise à l'administration chargée de l'examen préliminaire international parce que le déposant ne s'est pas conformé aux prescriptions de la règle 17.1, le rapport d'examen préliminaire international peut être établi comme si la priorité n'avait pas été revendiquée.» (règle 66.7.a))

«Si la demande dont la priorité est revendiquée dans la demande internationale est rédigée dans une langue autre que la ou les langues de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, cette dernière peut inviter le déposant à lui remettre une traduction dans ladite langue ou dans l'une desdites langues dans les deux mois suivant la date de l'invitation. Si la traduction n'est pas remise dans ce délai, le rapport d'examen préliminaire international peut être établi comme si la priorité n'avait pas été revendiquée.» (règle 66.7.b))

Voir également la règle 70.10 dans la note 10 ci-dessous.

3 «Le rapport indique si le déposant a payé des taxes additionnelles pour l'examen préliminaire international, ou si la demande internationale ou l'examen préliminaire international a été limité selon l'article 34.3). En outre, lorsque l'examen préliminaire international a été effectué sur la base de revendications limitées (article 34.3.a)) ou de l'invention principale seulement (article 34.3.c)), le rapport précise les parties de la demande internationale sur lesquelles l'examen préliminaire international a porté.» (règle 70.13)

La règle 68 intitulée «Absence d'unité de l'invention (examen préliminaire international)» s'énonce comme suit:

«68.1 Pas d'invitation à limiter ou à payer

Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention et décide de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, elle établit le rapport d'examen préliminaire international, sous réserve de l'article 34.4.b), pour la demande internationale entière, mais elle indique dans ce rapport que, selon son opinion, il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention et elle spécifie les motifs pour lesquels elle considère que cette exigence n'est pas satisfaisante.»

«68.2 Invitation à limiter ou à payer

Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention et décide d'inviter le déposant, au choix de ce dernier, à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, elle indique au moins une possibilité de limitation qui, à son avis, satisfait à cette exigence; elle précise le montant des taxes additionnelles et spécifie les motifs pour lesquels elle considère que l'exigence d'unité de l'invention n'est pas satisfaisante. Elle fixe en même temps un délai, qui tient compte des circonstances du cas d'espèce, pour donner suite à l'invitation; ce délai ne peut être inférieur à un mois ni supérieur à deux mois à compter de la date de l'invitation.»

«68.3 Taxes additionnelles

a) Le montant des taxes additionnelles pour l'examen préliminaire international, prévues à l'article 34.3.a), est fixé par l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international.

b) Les taxes additionnelles pour l'examen préliminaire international, prévues à l'article 34.3.a), doivent être payées directement à l'administration chargée de l'examen préliminaire international.

c) Tout déposant peut payer les taxes additionnelles sous réserve, c'est-à-dire en y joignant une déclaration motivée tendant à démontrer que la demande internationale remplit la condition d'unité de l'invention ou que le montant des taxes additionnelles demandées est excessif. Un comité de trois membres — ou toute autre instance spéciale — de l'administration chargée de l'examen préliminaire international ou toute autorité supérieure com-

pétente, examine la réserve et dans la mesure où il estime que la réserve est justifiée, ordonne le remboursement, total ou partiel, des taxes additionnelles au déposant. Sur requête du déposant, le texte de sa réserve et celui de la décision sont annexés au rapport d'examen préliminaire international et notifiés aux offices étrangers.

d) Le Comité de trois membres, l'instance spéciale ou l'autorité supérieure mentionnée à l'alinéa c) ne doit pas comprendre le fonctionnaire qui a pris la décision faisant l'objet de la réserve.»

«68.4 Procédure en cas de limitation insuffisante des revendications

Si le déposant limite les revendications d'une manière qui ne suffit pas pour satisfaire à l'exigence d'unité de l'invention, l'administration chargée de l'examen préliminaire international procède conformément à l'article 34.3.c).»

«68.5 Invention principale

En cas de doute sur la question de savoir quelle est l'invention principale aux fins de l'article 34.3.c), l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications est considérée comme l'invention principale.»

4 «Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime:

i) que la demande internationale concerne un objet à l'égard duquel elle n'est pas tenue, selon le règlement d'exécution, d'effectuer un examen préliminaire international et décide en l'espèce de ne pas effectuer un tel examen;

ii) que la description, les revendications ou les dessins ne sont pas clairs, ou que les revendications ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'une opinion valable ne peut être formée au sujet de la nouveauté, de l'activité inventive (non-evidente) ou de l'application industrielle de l'invention dont la protection est demandée;

elle n'aborde pas les questions mentionnées à l'article 33.1) et fait connaître au déposant cette opinion et ses motifs.» (article 34.4.a))

«Si l'une des situations mentionnées au sous-alinéa a) n'existe qu'à l'égard de certaines revendications ou en relation avec certaines revendications, les dispositions dudit sous-alinéa a) ne s'appliquent qu'à l'égard de ces revendications.» (article 34.4.b))

«Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime, lors de l'établissement du rapport d'examen préliminaire international, que l'une quelconque des situations mentionnées à l'article 34.4.a) existe, le rapport en fait état et indique les motifs... (article 35.3.a))

«Si l'une des situations mentionnées à l'article 34.4.b) existe, le rapport d'examen préliminaire international contient, pour les revendications en question, l'indication prévue au sous-alinéa a) et, pour les autres revendications, la déclaration indiquée à l'alinéa 2).» (article 35.3.b))

«... Lorsque la législation nationale de l'Office national qui agit en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international ne permet pas que les revendications dépendantes multiples soient rédigées d'une manière différente de celle qui est prévue dans les deuxièmes et troisièmes phrases de la règle 6.4.a), l'administration chargée de l'examen préliminaire international peut, si des revendications de sont pas rédigées de cette manière, appliquer l'article 34.4.b)...» (règle 66.2.a))

La règle 67 intitulée «Objet selon l'article 34.4.a)i)» se lit comme suit:

«67.1 Définition

Aucune administration chargée de l'examen préliminaire international n'a l'obligation de procéder à l'examen préliminaire international à l'égard d'une demande internationale dont l'objet, et dans la mesure où l'objet, est l'un des suivants:

i) théories scientifiques et mathématiques;

ii) variétés végétales, races animales, procédés essentiellement biologiques d'obtention de végétaux ou d'animaux, autres que procédés microbiologiques et produits obtenus par ces procédés;

iii) plans, principes ou méthodes en vue de faire des affaires, de réaliser des actions purement intellectuelles ou de jouer;

iv) méthodes de traitement du corps humain ou animal par la chirurgie ou la thérapie, ainsi que méthodes de diagnostic;

v) simples présentations d'informations;

vi) programmes d'ordinateurs dans la mesure où l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas outillée pour procéder à un examen préliminaire international au sujet de tels programmes.»

5 «Le rapport répète le classement indiqué selon la règle 43.3 [classement de l'objet de l'invention dans le rapport de recherche internationale] si l'administration chargée de l'examen préliminaire international maintient ce classement.» (règle 70.5.a))

«Sinon, l'administration chargée de l'examen préliminaire international indique le classement qu'elle considère comme correct, au minimum selon la classification internationale des brevets.» (règle 70.5.b))

6 «Le rapport d'examen préliminaire international ne contient aucune déclaration quant à la question de savoir si l'invention dont la protection est demandée est ou semble être brevetable ou non au regard d'une législation nationale quelconque. Il déclare, sous réserve de l'alinéa 3), en relation avec chaque revendication, si cette revendication semble répondre aux critères de nouveauté, d'activité inventive (non-evidente) et d'application industrielle, tels que ces critères sont définis, aux fins de l'examen préliminaire international, à l'article 33.1 à 4). Cette déclaration doit être accompagnée de la citation des documents qui semblent établir la conclusion déclarée, et de toutes explications qui peuvent s'imposer en l'espèce. A cette déclaration doivent également être jointes les autres observations prévues par le règlement d'exécution.» (article 35.2))

«La déclaration mentionnée à l'article 35.2) consiste en «OUI» ou «NON», ou l'équivalent de ces mots dans la langue du rapport, ou un signe

approprié spécifié dans les instructions administratives, et est, le cas échéant, accompagnée des citations, explications et observations mentionnées à la dernière phrase de l'article 35.2.» (règle 70.6.a))

« Si l'il n'est pas satisfait à l'un quelconque des trois critères mentionnés à l'article 35.2 (à savoir la nouveauté, l'activité inventive (non évidence) et l'application industrielle), la déclaration est négative. Si, dans un tel cas, il est satisfait à l'un ou à deux de ces critères pris séparément, le rapport précise celui ou ceux auxquels il est ainsi satisfait. (règle 70.6.b))

7. Voir l'article 35.2 dans la note précédente.

« Le rapport cite les documents considérés comme pertinents pour établir les déclarations faites selon l'article 35.2.» (règle 70.7.a))

« Les dispositions de la règle 43.5.b) et c) s'appliquent également au rapport.» (règle 70.7.b))

« La méthode d'identification de chaque document cité est fixée dans les instructions administratives.» (règle 43.5.b))

« Si certains passages seulement du document cité sont pertinents ou particulièrement pertinents, ces passages sont identifiés – par exemple en indiquant la page, la colonne ou les lignes où figure le passage considéré.» (règle 43.5.e))

« Tout document cité dans le rapport de recherche internationale est identifié, conformément à la règle 43.5.b), en indiquant les éléments suivants dans l'ordre ci-après:

a) S'il s'agit d'un document de brevet (les documents de brevets étant constitués par les brevets au sens de l'article 2 ii) ainsi que par les demandes publiées y relatives):

i) l'office qui a publié le document, selon le code à deux lettres figurant à l'annexe B;

ii) le type du document, selon les symboles appropriés prévus dans le Code normalisé pour l'identification de différents types de documents de brevets [ST. 16];

iii) le numéro attribué au document par l'office de publication; (pour les documents de brevets japonais, l'indication de l'année du règne de l'Empereur doit précéder le numéro de série du document de brevet);

iv) le nom du titulaire du brevet ou du déposant (en majuscules et, le cas échéant, sous forme abrégée);

v) la date de publication du document de brevet cité, telle qu'elle figure sur ce document; et

vi) le cas échéant, les pages, les colonnes ou les lignes où se trouvent les passages pertinents ou les figures pertinentes des dessins.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un document de brevet conformément aux dispositions de l'alinéa a) ci-dessus:

JP, B, 50-14535 (NCR CORPORATION) 28 mai 1973 (28.05.73), voir colonne 4, lignes 3 à 27.)

b) S'il s'agit d'un livre ou d'une autre publication éditée isolément:

i) le nom de l'auteur;

ii) le titre (en précisant, le cas échéant, l'édition et/ou le volume);

iii) l'année de la publication (lorsque celle-ci coïncide avec l'année de la demande internationale ou de la revendication de priorité, l'administration chargée de la recherche internationale doit s'efforcer de déterminer le mois et, si besoin est, le jour de la publication, et d'indiquer ces données dans le rapport de recherche internationale);

iv) le nom de l'éditeur;

v) s'il est connu, le lieu de publication (lorsque le livre ou la publication éditée isolément précise uniquement l'adresse de l'éditeur, cette dernière doit être indiquée comme lieu de publication); et

vi) le cas échéant, les pages, les colonnes ou les lignes où se trouvent les passages pertinents ou les figures pertinentes des dessins.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un livre ou une autre publication éditée isolément, conformément aux dispositions de l'alinéa b) ci-dessus:

H. Walton, «Microwave Quantum Theory», volume 2, publié en 1973, par Sweet and Maxwell (Londres), voir pages 138 à 192 et plus particulièrement les pages 146 à 148.)

c) S'il s'agit d'un article publié dans un périodique ou une autre publication en série:

i) le titre du périodique ou de la publication en série;

ii) le numéro du volume et la date du fascicule qui contient l'article;

iii) s'il est connu, le lieu de publication (lorsque le périodique ou la publication en série précise uniquement l'adresse de l'éditeur, cette dernière doit être indiquée comme lieu de publication);

iv) l'auteur et le titre de l'article ainsi que le numéro des pages auxquelles commence et se termine l'article; et

v) le cas échéant, les pages, les colonnes ou les lignes où se trouvent les passages pertinents ou les figures pertinentes des dessins.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un article publié dans un périodique ou une autre publication en série, conformément aux dispositions de l'alinéa c) ci-dessus:

IBM Technical Disclosure Bulletin volume 17, N° 5, publié en octobre 1974 (Armonk, New York). J. G. Drop, «Integrated Circuit Personalization at the Module Level», voir pages 1344 et 1345.)

d) S'il s'agit d'abréviés:

i) l'identification du document contenant l'abrégié, de la manière indiquée aux alinéas a), b) ou c), respectivement, selon que l'abrégié figure dans un document de brevet, dans un livre ou une publication éditée isolément, ou dans un article publié dans un périodique ou une autre publication en série;

ii) au cas où l'abrégié n'accompagne pas le document complet qui lui a servi de base, l'identification de l'abrégié et du document complet sur la base des données bibliographiques disponibles à cet égard.

(L'exemple suivant illustre la façon de citer un abrégié conformément aux dispositions de l'alinéa d) ii) ci-dessus:

Chemical Abstracts, volume 75, N° 20, publié le 15 novembre 1971 (Columbus, Ohio, U.S.A.). D. I. Shetalov, «Surface Effects During Metal Fatigue», voir page 163, colonne 1, l'abrégié N° 120718k, Fiz.-Khim. Mekh. Mater. 1971, 7-11 (Russ.).» (Instruction 503)

8. Voir l'article 35.2 dans la note ci-dessus.

« Les instructions administratives contiennent des principes directeurs pour les cas où les explications mentionnées à l'article 35.2) devraient ou ne devraient pas être données, ainsi que pour la forme de ces explications. Ces principes directeurs doivent se baser sur les principes suivants:

i) des explications doivent être données chaque fois que la déclaration est négative à l'égard d'une revendication quelconque;

ii) des explications doivent être données chaque fois que la déclaration est positive, sauf si les raisons qui ont conduit à citer un document quelconque sont faciles à imaginer sur la base de la consultation du document cité;

iii) en règle générale, des explications doivent être données dans le cas prévu à la dernière phrase de la règle 70.6.b).» (règle 70.8)

« Les explications selon la règle 70.8 doivent indiquer clairement celui des trois critères visés à l'article 35.2), pris séparément, auquel s'applique tout document cité et préciser, en se référant aux documents cités, les raisons qui ont amené à conclure qu'il a été satisfait ou non à l'un quelconque desdits critères.» (Instruction 604)

9. « Toute divulgation non écrite visée dans le rapport en raison de la règle 64.2 est mentionnée par l'indication de son genre, par la date à laquelle la divulgation écrite qui se réfère à la divulgation non écrite a été rendue accessible au public et par la date à laquelle cette dernière a été faite publiquement.» (règle 70.9)

« Dans les cas où la mise à la disposition du public a eu lieu par le moyen d'une divulgation orale, d'une utilisation ou d'une exposition, ou par d'autres moyens non écrits («divulgation non écrite») avant la date pertinente telle que définie à la règle 64.1.b), et où la date de cette divulgation non écrite est indiquée dans une divulgation écrite qui a été rendue accessible au public après la date pertinente, la divulgation non écrite n'est pas considérée comme faisant partie de l'état de la technique aux fins de l'article 33.2) et 3). Toutefois, le rapport d'examen préliminaire international doit mentionner une telle divulgation non écrite de la manière prévue à la règle 70.9.» (règle 64.2)

10. « Toute demande publiée et tout brevet visés dans le rapport en raison de la règle 64.3 sont mentionnés en tant que tels; le rapport indique leur date de publication, leur date de dépôt et leur date de priorité revendiquée (le cas échéant). A l'égard de la date de priorité d'un tel document, le rapport peut indiquer que l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que cette date n'a pas été valablement revendiquée.» (règle 70.10)

« Lorsqu'une demande ou un brevet, qui ferait partie de l'état de la technique aux fins de l'article 33.2) et 3) s'il avait été publié avant la date pertinente mentionnée à la règle 64.1, a été publié, en tant que tel, après la date pertinente mais a été déposé avant la date pertinente ou revendiquée la priorité d'une demande antérieure déposée avant la date pertinente, cette demande publiée ou ce brevet publié n'est pas considérée comme faisant partie de l'état de la technique aux fins de l'article 33.2) et 3). Toutefois, le rapport d'examen préliminaire international doit mentionner une telle demande ou un tel brevet de la manière prévue à la règle 70.10.» (règle 64.3)

11. « Si l'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'au moment où elle prépare le rapport:

i) la demande internationale tombe sous le coup de la règle 66.2.a) iii) [la demande internationale est incorrecte quant à sa forme ou à son contenu selon le traité ou son règlement d'exécution], elle l'indique dans le rapport en motivant son opinion:

ii) la demande internationale appelle l'une des observations mentionnées à la règle 66.2.a) v) [observations relatives à la clarté des revendications, de la description ou des dessins, ou à la question de savoir si les revendications se basent entièrement sur la description], elle peut l'indiquer dans le rapport et, si elle le fait, elle motive son opinion.» (règle 70.12)

12. Voir la règle 70.12.B) dans la note précédente.

1). (a) Une séquence de nucléotides étant un produit chimique elle doit être en principe définie par sa structure.

Une définition par le résultat recherché ou par la fonction n'est pas admissible (voir p.e. revendications 1,2,8 et 9; les expressions "capable d'exprimer", "capable d'hybrider", "capable de former un complexe immunologique").

Les mêmes remarques sont aussi valables pour la définition des sondes (voir p.e. revendications 2 ou 9) ou d'un polypeptide (voir revendication 19).

Bien qu'il soit, exceptionnellement, possible de définir un produit chimique à l'aide de plusieurs paramètres, ces paramètres doivent néanmoins définir le produit précisément. En outre il est nécessaire que la définition par des paramètres permet la distinction des produits connus.

(b) Dans le cas présent il faut donc délimiter clairement l'objet des revendications présentes par rapport aux séquences de nucléotide et aux polypeptides qui sont décrits dans l'art antérieur (voir notamment EP-A-0224331 (document 1) et Molecular Biology of Microbial Differentiation, Proc. 9th Int. Spore Conf., Asilomar (CA), US, 3-6 September 1984, American Society for Microbiology, pages 217-224, Document 2).

Au vu des objections mentionnées au-dessus une définition de la séquence présente par une combinaison des revendications 1,3 et 5 semblerait acceptable sous l'Article 6 PCT.

(c) Des dénominations arbitraires ne sont pas acceptables dans une revendication (voir p.e. revendications 2,16,22 ou 26).

(d) Dans les procédés selon les revendications 21-27 la

caractéristique essentielle est aussi la séquence de nucléotides utilisée pour la "réalisation d'une hybridation". En conséquence il faut que cette séquence soit définie dans ces revendications conformément aux objections mentionnées au-dessus.

(e) En ce qui concerne les revendications qui se réfèrent aux revendications mentionnées ci-dessus, leur clarté dépend d'une définition suffisamment claire de l'objet des revendications indépendantes.

(f) L'objet des revendications 32-36 n'est pas supporté par des exemples mais seulement par des passages spéculatifs. Il semble donc que l'objet de ces revendications n'est pas exposé de façon suffisamment claire et complète pour qu'un homme du métier puisse l'executer.

TRAITE DE COOPERATION  
EN MATIERE DE BREVETS

NO DE LA DEMANDE INTERNATIONALE: PCT/FR88/00292

Destinataire:

PEAUCELLE, Chantal  
S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud  
67, boulevard Haussmann  
F-75008 Paris  
FRANCE

REÇUS 19.01.89

DATE D'EXPEDITION DE CETTE  
NOTIFICATION:

19 janvier 1989 (19.01.89)

COTE DU DOSSIER DU DEPOSANT OU  
DU MANDATAIRE:

06458

Expéditeur:

Le Bureau international de l'OMPI  
1211 Genève 20  
Suisse

DEPOSANT (NOM):

INSTITUT PASTEUR etc.

DATE DU DEPOT INTERNATIONAL:

09 juin 1988 (09.06.88)

Le Bureau international a notifié, comme le prévoit l'article 31.7) du PCT, chacun des offices suivants de son élection:

OFFICES NATIONAUX DE: JP,US

OA

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale", avant l'expiration d'un délai de trente mois à compter de la date de priorité, auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus, à condition que l'élection correspondante ait été effectuée avant l'expiration du 19ème mois à compter de la date de priorité. Ceci doit être effectué en accomplissant les actes mentionnés à l'article 39.1.a) du PCT (c'est-à-dire, payer la ou les taxes nationales et fournir, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale), ainsi que, le cas échéant, en transmettant la traduction de toute annexe au rapport d'examen préliminaire international conformément à l'article 36.3)b) et à la règle 74.1 du PCT.

Les Offices suivants ont fixé des délais plus tardifs:

- AU et BG: 31 mois à compter de la date de priorité;  
- EP: la taxe nationale, la ou les taxes de désignation, la taxe de recherche et toute taxe de revendication (mais pas la taxe d'examen ni, le cas échéant, toute taxe de renouvellement exigible avant l'expiration du délai de 30 mois) peuvent être payées dans le mois qui suit l'expiration du délai de 30 mois.

Des informations détaillées concernant les actes à accomplir ainsi que les délais applicables figurent dans l volume II du Guide du déposant du PCT.

Formulaire PCT/IB/332 (juin 1988).

J. Zahra  
(fonctionnaire autorisé)

0645 HH

Torine larnacit.

TRAITE DE COOPERATION  
EN MATIERE DE BREVETS

NO DE PUBLICATION INTERNATIONALE: W088/09812  
NO DE LA DEMANDE INTERNATIONALE: PCT/FR88/00292

NOTICE

INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES  
DESIGNES  
émise en vertu de la règle  
47.1.c), première phrase, du  
PCT

DATE D'EXPEDITION DE CETTE NOTICE  
15 décembre 1988 (15.12.88)

COTE DU DOSSIER DU DEPOSANT OU  
DU MANDATAIRE  
06458

Destinataire:

PEAUCELLE, Chantal  
S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud  
67, boulevard Haussmann  
F-75008 Paris  
FRANCE

Expéditeur:

Le Bureau international de l'OMPI  
1211 Genève 20  
Suisse

Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cette notice, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20 du PCT, la demande internationale visée ci-dessus aux offices désignés suivants:

aux offices nationaux de JP, US, et à l'OA

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chaque office désigné en accomplissant, dans le délai applicable selon l'article 22 ou 39.1 du PCT, les actes qui y sont visés.

En vertu de la règle 47.1.c) du PCT, troisième phrase, chaque office désigné a été informé, séparément de la communication de la demande internationale, de l'envoi de la présente notice et de la date à laquelle elle a été envoyée.

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES  
DOTES D'UNE ACTIVITE LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERES

---

5 L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

10 Elle vise plus spécialement des moyens, en particulier des séquences nucléotidiques, des polypeptides ou encore des vecteurs, ou des souches bactériennes, modifiés par ces séquences et exprimant des polypeptides permettant de préparer des compositions larvicides actives vis-à-vis de lépidoptères, de préférence vis-à-vis de Spodoptera littoralis (ci-après S.littoralis) ou Mamestra brassicae (ci-après désignée par M.brassicae) ou capables de transformer les plantes à 15 traiter en leur conférant ce type d'activité.

On sait que la plupart des isolats de B.thuringiensis présentent une activité toxique à l'égard de larves de plus de cent espèces de lépidoptères.

20 Cette activité résulte, de la capacité des souches de B.thuringiensis à synthétiser, au moment de la sporulation, des inclusions cristallines de nature protéique, ou δ-endotoxines, sous le contrôle d'un ou plusieurs types de gènes.

25 On a montré que l'activité de ces polypeptides est contenue dans la moitié NH<sub>2</sub>-terminale ou N-terminale de la protéine.

30 Les travaux réalisés ont montré la spécificité élevée des δ-endotoxines vis-à-vis de larves d'une espèce donnée.

En raison de cette spécificité élevée, de nombreuses espèces de lépidoptères, notamment de la famille des Noctuelles, ne réagissent que faiblement aux préparations commerciales de B.thuringiensis disponibles.

35 Il en est ainsi en particulier de l'espèce

Abel 12/1/85

5 S.littoralis, insecte polyphage qui constitue le principal parasite du coton et d'autres cultures industriellement importantes. Parmi ces cultures, on citera le maïs, le ricin, le tabac, l'arachide, des plantes fourragères, telles que le trèfle ou la luzerne, ou encore des produits maraîchers comme le chou ou la tomate.

On conçoit donc l'intérêt de disposer de moyens ciblant spécifiquement et efficacement la famille des Noctuelles et notamment S.littoralis ou M.brassicae.

10 Les gènes de δ-endotoxines identifiés à ce jour, ne codent pas pour un polypeptide actif préférentiellement à l'égard de S.littoralis.

15 La recherche par les inventeurs d'une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide actif de préférence vis-à-vis des Noctuelles, plus spécialement vis-à-vis de S.littoralis, les a conduits à étudier les isolats naturels de deux souches de B.thuringiensis dont l'activité larvicide sur S.littoralis apparaît plus élevée que celle des préparations industrielles faites à 20 partir d'autres souches de B.thuringiensis.

Il s'agit des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01.

25 L'étude de ces isolats a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs gènes de δ-endotoxines de structures différentes et de spécificités différentes, dont deux gènes préférentiellement actifs contre P.brassicae mais peu actifs vis-à-vis de la Noctuelle du coton et un gène inactif vis-à-vis de P.brassicae et de S.littoralis.

30 En étudiant l'ADN total de ces isolats et en effectuant des hybridations appropriées, suivies du clonage des fragments identifiés par hybridation, les inventeurs ont constaté qu'il est possible d'isoler des séquences nucléotidiques impliquées dans des gènes de δ-endotoxines codant pour des polypeptides actifs, de 35

préférence contre S.littoralis.

L'invention a donc pour but de fournir des séquences nucléotidiques capables de coder pour au moins la partie  $\text{NH}_2$ -terminale d'une  $\delta$ -endotoxine toxique contre les Noctuelles, de préférence contre S.littoralis ou M.brassicae.

Elle a également pour but de fournir un polypeptide toxique à l'égard des Noctuelles.

L'invention vise en outre un procédé d'obtention d'une telle séquence et d'un polypeptide présentant l'activité recherchée ainsi que les moyens intermédiaires tels que vecteurs et souches bactériennes utilisables pour l'obtention du polypeptide.

L'invention vise de plus les applications de ces séquences et polypeptides pour l'élaboration de compositions larvicides à l'égard des Noctuelles, en particulier de S.littoralis et pour la transformation des plantes susceptibles d'être infectées par ces larves.

L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de façon spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S.littoralis.

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle est portée par une séquence de nucléotides d'environ 3kb telle qu'obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences de nucléotides de B.thuringiensis capables de s'hybrider avec des sondes 1, 2 et 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2. Le fragment de 3kb correspond plus spécialement au fragment de restriction HindIII-PstI.

Les séquences de nucléotides de l'invention

sont, en outre, caractérisées en ce qu'elles comportent des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII KpnI - HindIII - PstI.

De manière préférée, ces séquences de nucléotides sont obtenues par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN provenant d'au moins une souche de B.thuringiensis. Dans une variante de réalisation de l'invention, deux souches différentes de B.thuringiensis sont mises en oeuvre.

Des souches de B.thuringiensis particulièrement appropriées pour l'obtention de ces séquences de nucléotides sont les souches correspondant à aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, déposées le 21 Avril 1987 respectivement sous les n° 1-661 et n° I-660 à la Collection nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) à Paris.

D'une manière avantageuse, les séquences de nucléotides de l'invention codent pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides présentant l'activité larvicide à l'égard de S.littoralis.

Une séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

52 GTC TAC TTG ACA CGG GTC GCA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA  
TAT CGG GCA TAT ATT GAT ATT TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT 112  
TTG TAT TTT TTC ATA ACA TGT GTC ATA TGT ATT AAA TCG TGG 172  
TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA  
ATA AAA AAA CGG AGG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT 232  
CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT CCT GAA GAA GTA 292  
CTT TTG GAT GGA GAA CGG ATA TCA ACT CGT AAT TCA TCA ATT  
GAT ATT TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT 352  
GTA CCA GGG GGA GGA TTT TTA GTT GCA TTA ATA GAT TTT GTA 412  
TGG GGA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA  
CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT 472  
AGG AAT GCT GCT ATT GCT AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT 532  
TTC AAT ATA TAT GTG GAA GCA TTT AAA GAA TGG GAA GAA GAT 592  
CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT  
CGT ATA CTT GAT GGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT 652  
CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA TCC GTT TAT GCT 712  
CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA  
ATT TTT GGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT 772  
GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT AGG CAT ATT GAT GAA TAT GCT 832  
GAT CAC TGT GCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA  
CCG AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA 892  
CGG AGA GAC TTA ACA TTG ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC 952  
TTT CCA AAC TAT GAC

Des séquences de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent l'enchaînement (I) défini ci-dessus.

D'une manière avantageuse, la séquence de nucléotides caractérisée par l'enchaînement défini ci-dessus code pour une partie d'un polypeptide ayant une activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis plus élevée que celle des polypeptides codés par des isolats naturels actuellement connus pour leurs effets vis-à-vis de S.littoralis.

L'étude de cette séquence de nucléotides montre qu'elle est caractérisée par un codon d'initiation ATG situé en position 241 à partir duquel une phase ouverte de lecture de 750 nucléotides a été identifiée.

Cette séquence est également caractérisée par un site d'attachement des ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

Selon un autre aspect, la séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comporte, en amont du codon ATG, une séquence allant du nucléotide en position 137 au nucléotide en position 177, fortement homologue à la région trouvée par Wong et al. (1983) et décrit dans (16) en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) et dont les auteurs ont montré qu'elle contenait trois promoteurs BtI, BtII et Ec qui sont respectivement fonctionnels chez B.thuringiensis et E.coli. L'homologie de ces séquences est d'environ 70%.

L'invention concerne également une séquence de nucléotides codant pour la séquence (II) d'acides aminés suivante :

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN  
GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL  
LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE  
ASP ILE SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE  
VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP  
GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN  
ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG  
ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE  
ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO  
ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP PRG PHE ARG  
ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG  
ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR ALA GLN  
ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE  
PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU  
ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP  
HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO  
LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG  
ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE  
PRO ASN TYR ASP

Une meilleure identification de la séquence de nucléotides isolée des souches ci-dessus, déposées à la CNCM a permis de constater que le nucléotide situé en position 273 est la guanine (G), l'acide aminé résultant du codon GTA étant alors la valine.

Or, la lecture du nucléotide correspondant à cette position 273 dans la demande FR.8708090 du 10 juin 1987 avait conduit à mentionner la thymine (T) et, comme acide aminé résultant du codon TTA, la leucine.

Une autre séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée par sa capacité d'hybridation avec une sonde formée à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

15

20

25

30

35

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000  
1001  
1002  
1003  
1004  
1005  
1006  
1007  
1008  
1009  
1001  
1002  
1003  
1004  
1005  
1006  
1007  
1008  
1009  
1010  
1011  
1012  
1013  
1014  
1015  
1016  
1017  
1018  
1019  
1011  
1012  
1013  
1014  
1015  
1016  
1017  
1018  
1019  
1020  
1021  
1022  
1023  
1024  
1025  
1026  
1027  
1028  
1029  
1021  
1022  
1023  
1024  
1025  
1026  
1027  
1028  
1029  
1030  
1031  
1032  
1033  
1034  
1035  
1036  
1037  
1038  
1039  
1031  
1032  
1033  
1034  
1035  
1036  
1037  
1038  
1039  
1040  
1041  
1042  
1043  
1044  
1045  
1046  
1047  
1048  
1049  
1041  
1042  
1043  
1044  
1045  
1046  
1047  
1048  
1049  
1050  
1051  
1052  
1053  
1054  
1055  
1056  
1057  
1058  
1059  
1051  
1052  
1053  
1054  
1055  
1056  
1057  
1058  
1059  
1060  
1061  
1062  
1063  
1064  
1065  
1066  
1067  
1068  
1069  
1061  
1062  
1063  
1064  
1065  
1066  
1067  
1068  
1069  
1070  
1071  
1072  
1073  
1074  
1075  
1076  
1077  
1078  
1079  
1071  
1072  
1073  
1074  
1075  
1076  
1077  
1078  
1079  
1080  
1081  
1082  
1083  
1084  
1085  
1086  
1087  
1088  
1089  
1081  
1082  
1083  
1084  
1085  
1086  
1087  
1088  
1089  
1090  
1091  
1092  
1093  
1094  
1095  
1096  
1097  
1098  
1099  
1091  
1092  
1093  
1094  
1095  
1096  
1097  
1098  
1099  
1100  
1101  
1102  
1103  
1104  
1105  
1106  
1107  
1108  
1109  
1101  
1102  
1103  
1104  
1105  
1106  
1107  
1108  
1109  
1110  
1111  
1112  
1113  
1114  
1115  
1116  
1117  
1118  
1119  
1111  
1112  
1113  
1114  
1115  
1116  
1117  
1118  
1119  
1120  
1121  
1122  
1123  
1124  
1125  
1126  
1127  
1128  
1129  
1121  
1122  
1123  
1124  
1125  
1126  
1127  
1128  
1129  
1130  
1131  
1132  
1133  
1134  
1135  
1136  
1137  
1138  
1139  
1131  
1132  
1133  
1134  
1135  
1136  
1137  
1138  
1139  
1140  
1141  
1142  
1143  
1144  
1145  
1146  
1147  
1148  
1149  
1141  
1142  
1143  
1144  
1145  
1146  
1147  
1148  
1149  
1150  
1151  
1152  
1153  
1154  
1155  
1156  
1157  
1158  
1159  
1151  
1152  
1153  
1154  
1155  
1156  
1157  
1158  
1159  
1160  
1161  
1162  
1163  
1164  
1165  
1166  
1167  
1168  
1169  
1161  
1162  
1163  
1164  
1165  
1166  
1167  
1168  
1169  
1170  
1171  
1172  
1173  
1174  
1175  
1176  
1177  
1178  
1179  
1171  
1172  
1173  
1174  
1175  
1176  
1177  
1178  
1179  
1180  
1181  
1182  
1183  
1184  
1185  
1186  
1187  
1188  
1189  
1181  
1182  
1183  
1184  
1185  
1186  
1187  
1188  
1189  
1190  
1191  
1192  
1193  
1194  
1195  
1196  
1197  
1198  
1199  
1191  
1192  
1193  
1194  
1195  
1196  
1197  
1198  
1199  
1200  
1201  
1202  
1203  
1204  
1205  
1206  
1207  
1208  
1209  
1201  
1202  
1203  
1204  
1205  
1206  
1207  
1208  
1209  
1210  
1211  
1212  
1213  
1214  
1215  
1216  
1217  
1218  
1219  
1211  
1212  
1213  
1214  
1215  
1216  
1217  
1218  
1219  
1220  
1221  
1222  
1223  
1224  
1225  
1226  
1227  
1228  
1229  
1221  
1222  
1223  
1224  
1225  
1226  
1227  
1228  
1229  
1230  
1231  
1232  
1233  
1234  
1235  
1236  
1237  
1238  
1239  
1231  
1232  
1233  
1234  
1235  
1236  
1237  
1238  
1239  
1240  
1241  
1242  
1243  
1244  
1245  
1246  
1247  
1248  
1249  
1241  
1242  
1243  
1244  
1245  
1246  
1247  
1248  
1249  
1250  
1251  
1252  
1253  
1254  
1255  
1256  
1257  
1258  
1259  
1251  
1252  
1253  
1254  
1255  
1256  
1257  
1258  
1259  
1260  
1261  
1262  
1263  
1264  
1265  
1266  
1267  
1268  
1269  
1261  
1262  
1263  
1264  
1265  
1266  
1267  
1268  
1269  
1270  
1271  
1272  
1273  
1274  
1275  
1276  
1277  
1278  
1279  
1271  
1272  
1273  
1274  
1275  
1276  
1277  
1278  
1279  
1280  
1281  
1282  
1283  
1284  
1285  
1286  
1287  
1288  
1289  
1281  
1282  
1283  
1284  
1285  
1286  
1287  
1288  
1289  
1290  
1291  
1292  
1293  
1294  
1295  
1296  
1297  
1298  
1299  
1291  
1292  
1293  
1294  
1295  
1296  
1297  
1298  
1299  
1300  
1301  
1302  
1303  
1304  
1305  
1306  
1307  
1308  
1309  
1301  
1302  
1303  
1304  
1305  
1306  
1307  
1308  
1309  
1310  
1311  
1312  
1313  
1314  
1315  
1316  
1317  
1318  
1319  
1311  
1312  
1313  
1314  
1315  
1316  
1317  
1318  
1319  
1320  
1321  
1322  
1323  
1324  
1325  
1326  
1327  
1328  
1329  
1321  
1322  
1323  
1324  
1325  
1326  
1327  
1328  
1329  
1330  
1331  
1332  
1333  
1334  
1335  
1336  
1337  
1338  
1339  
1331  
1332  
1333  
1334  
1335  
1336  
1337  
1338  
1339  
1

991  
act acc aca taa cca ari cag cca gtt gct caa cta aca acc gaa act taa acc gac cca tta att aat ttt aat cca cgg tta cag tca  
1001  
1171  
cfa cct caa tta cct act ttt aac gtt ari gaa gca ari acc gca acc gca att aat ctt aca aic ttt  
1261  
acc gat tcc ttt aca ttt aca ccc aat ttt taa gca gta cta gca gta aia tct acc gac aca tca aca tct cct  
1351  
ata taa cca aca gac gcc aac cag gag cct cca aca tcc ttt act ttt aat gaa ccc gta ttt aca act tta tca att cct act tta cgg  
1441  
tta tta cgg caa ccc tgg cgg cgg taa ctt ggt gaa gca gta gaa ttt tct aca ccc aca ttt tct acc ttt aca ttt  
1531  
cca gca aca ccc acc gtt taa act gaa ttt ccc cct gaa gat aat gtt gtt cca ccc gaa gca ttt aca ttt tca tct  
1621  
cat gca act ttt gtt caa aca acc tct gca gta act gat gta gta act cct gtt gca act ctt ctt aca aat  
1711  
aca aat taa cca aca att aat caa aia cct tta gtc gaa gaa ttt aca gca cca cgg ttt  
1801  
aca gca ccc gat aac ctt cca aca aai acc ttt gct gat ttt gta tct cta cta cta gtc aat aat tca cca aat acc tca tcc cct  
1891  
tta aca ttt ccc taa ccc tcc acc ggt acc gac gca gta gta gca gca



De façon particulière, des séquences de nucléotides de l'invention codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S. littoralis comprennent ou sont constituées par l'enchainement (III) défini précédemment.

10 L'enchainement (III), compris dans la séquence de nucléotides de l'invention, contient 2711 nucléotides. Ce fragment comprend notamment le promoteur potentiel du gène de la  $\delta$ -endotoxine active sur S. littoralis.

15 Entrent naturellement dans le cadre de la présente invention, des séquences de nucléotides modifiées par rapport aux enchaînements (I) ou (III) décrits ci-dessus, dans la mesure où ces modifications ne génèrent pas des variations sensibles de la toxicité du polypeptide codé par la séquence modifiée, vis-à-vis de S. littoralis.

Ces modifications peuvent par exemple consister en des délétions, substitutions, recombinaisons.

20 Ainsi les séquences de nucléotides (I) et (III) comportent en leur position 611 un nucléotide variable correspondant à l'adénine (A) dans la séquence (I) et à la cytosine (C) dans la séquence (III). Ces nucléotides entrent dans la composition des codons respectifs GAA et 25 GCA qui codent respectivement pour les acides aminés acide glutamique (GLU) et alanine (ALA) dans les séquences respectives II et IV.

30 De même toute séquence de nucléotides hybrideable avec celle des enchainements (I) ou (III), telle qu'obtenue par transformation enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique entre également dans le cadre des définitions de l'invention.

35 La séquence de nucléotides de formule (III) commence par un codon d'initiation ATG situé en position 241 et qui représente le début d'une phase ouverte de

13

lecture de 2470 nucléotides.

L'invention concerne en outre une séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés ci-après :

5

10

15

20

25

30

35

271 MET GLU GLU ASN ASN GLN GLN CYS ILE  
281 GLU ILE GLN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER SER ILE ASP ILE SER ASN  
291 GLU VAL GLN PRO LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU ILE ASP PHE VAL IAP GLY ILE VAL GLY PRO SER  
301 GLN IAP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ILE GLA ASN ILE GLU  
311 GLU ILE GLU GLN ASN ILE TYR VAL GLU GLN PHE LYS GLU GLU IAP GLU GLU ASN PRO ASN PRO ASN TYR ARG TYR ARG VAL ILE  
321 GLN ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR  
331 GLN GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG IAP GLY LEU ILE ASN VAL ASN GLU  
341 GLN ILE GLU ASN ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER  
351 IAP ILE GLN ASP IAP ILE ILE TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU TYR LEU TYR ASN ARG ASN TYR ASN TYR ASN

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLN PRO VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SEA  
106<sup>1</sup> VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL PHE GLU SER SER ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE  
117<sup>1</sup> IMA ASP TR PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR IAP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER ASN ILE GLY GLY GLY ASN ILE THR SER PRO  
126<sup>1</sup> ILC TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO ARG PRO ASN SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG  
135<sup>1</sup> ILC LEU LM GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ASN GLY GLY GLU GLU GLY VAL GLU PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR IMA  
144<sup>1</sup> ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER ASN LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS  
152<sup>1</sup> HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLN SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER THR HIS ARG SER GLA THR LEU THR ASN  
162<sup>1</sup> THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILL PRO LEU VAL LYS GLT PHE ARG VAL PHE GLT GLY GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE  
171<sup>1</sup> ILE GLY GLY ASP ILC LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG  
180<sup>1</sup> ILL PHE PHE ARG ARG IMA SER ASN SER ASN PRO VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY GLY GLY GLN VAL SER VAL



L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage comportant plus particulièrement au moins une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, en particulier au moins une 5 partie de la séquence d'environ 3kb.

Un vecteur recombinant particulier est par exemple un plasmide comprenant le fragment HindIII-PstI de la séquence de nucléotides de l'invention, inséré dans un vecteur pUC9. Un premier vecteur préféré est le plasmide pHT71 dont la construction est rapportée dans les 10 ensembles ci-après, qui comprend un fragment d'ADN HindIII-PstI selon l'invention constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

Un autre vecteur recombinant est constitué par 15 le plasmide pHT 671 dont la construction est donnée dans la figure 4. Ce plasmide comprend un fragment HindIII-PstI chimère, obtenu en fusionnant un fragment d'ADN HindIII-HindII de 1,1 kb provenant de la souche entomocidus 6-01 avec un fragment HincII-PstI de 1,9 kb 20 issu de la souche aizawai 7-29.

Entrent également dans le cadre de l'invention les souches bactériennes modifiées qui comportent l'une 25 des séquences nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant d'expression et de clonage défini précédemment, de préférence le plasmide pHT 671 ou le plasmide pHT71.

L'invention vise en outre un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, s'attaquant aux 30 feuilles de coton ou des autres cultures telles qu'énumérées ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

35 L'invention vise plus particulièrement la

partie NH<sub>2</sub>-terminale de ce polypeptide qui renferme l'activité larvicide.

L'extrémité de la partie NH<sub>2</sub>-terminale active répond à la séquence (II) d'acides aminés donnée ci-dessus.

5 Un polypeptide préféré de l'invention est celui qui répond à cette séquence (II) et répond à la séquence (IV) d'acides aminés donnée dans les pages précédentes. Ce polypeptide répondant à la séquence (IV) comprend 823 10 acides aminés. Sa masse moléculaire calculée est de 92906 Da.

Cette séquence de δ-endotoxine a été comparée aux séquences en acides aminés des δ-endotoxines provenant d'autres souches de B.thuringiensis actives sur 15 les lépidoptères et dont les gènes ont été isolés et séquencés précédemment : il s'agit des δ-endotoxines des souches kurstaki HD1 (19), kurstaki HD73 (20), berliner 1715 (21) et (22) Sotto (23) et aizawai IPL7 (24).

20 Les résultats de ces comparaisons indiquent que toutes sont différentes dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620) alors que la partie NH<sub>2</sub> terminale (acides aminés 1 à 280) et le domaine COOH 25 terminal (acides aminés 621 à 1175) de la protéine sont très conservés et ne diffèrent que par quelques acides aminés. En revanche la δ-endotoxine correspondant à la 30 séquence (IV) ci-dessus présente des différences importantes avec les autres δ-endotoxines, aussi bien dans la partie NH<sub>2</sub> terminale (acides aminés 1 à 280) que dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620). Les résultats de ces comparaisons indiquent encore 35 que la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule (acides aminés 1 à 620) qui correspond à la fraction toxique de la protéine ne présente que 46% d'homologie avec les autres δ-endotoxines. Les différences les plus importantes se situent dans la seconde moitié de la partie toxique de la

molécule (acides aminés 281 à 620) avec seulement 36% d'acides aminés identiques, la partie NH<sub>2</sub>-terminale (acides aminés 1 à 280) présentant quant à elle 58% d'acides aminés identiques avec les autres δ-endotoxines.

5 De telles différences importantes n'ont jamais été observées jusqu'à présent dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la fraction toxique de la molécule, parmi les δ-endotoxines actives sur les lépidoptères.

Pour obtenir une séquence de nucléotides entrant dans le cadre de l'invention, codant pour au moins 10 la partie active d'un polypeptide présentant une toxicité spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, on a recours, conformément à l'invention, 15 aux étapes suivantes, à savoir :

- la réalisation d'une hybridation moléculaire entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis, et d'autre part au moins deux séquences de nucléotides, utilisées 20 comme sondes, provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène de δ-endotoxine de B.thuringiensis, cette partie codant pour la partie NH<sub>2</sub>-terminale du polypeptide actif sur les larves de lépidoptères et de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du 25 polypeptide,

- l'isolement du fragment hybridé,
- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

De manière avantageuse, les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène de δ-endotoxine provenant de la souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130 kDa, active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

Dans un mode de réalisation du procédé précédent, 35 le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de

clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant d'une unique souche de B.thuringiensis, de préférence aizawai 7-29. En particulier ce fragment est porté préférentiellement par le 5 plasmide recombinant pHTA6 tel qu'isolé à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences 10 nucléotides issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de 15 clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins deux souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou 20 partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif, de manière préférentielle, vis-à-vis de S.littoralis.

Dans ce cas, le fragment recombiné utilisé dans l'étape de clonage est un fragment de 3kb environ, 25 élaboré avantageusement à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII d'environ 1,1kb provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment HincII-PstI d'environ 1,9kb de la souche aizawai 7-29. Il correspond à un gène tronqué de δ-endotoxine.

30 Les fragments de restriction HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés plus spécialement par les plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6 tels qu'isolés à l'aide de la sonde constituée par le fragment PvuII dont question ci-dessus.

35 L'étude de la toxicité, vis-à-vis des larves de

lépidoptères, des souches bactériennes modifiées à l'aide des séquences de nucléotides définies ci-dessus, a permis de mettre en évidence leur activité毒ique élevée, notamment à l'égard des chenilles de S.littoralis.

5 Cette activité a été appréciée au regard de l'indice de spécificité correspondant au rapport

CL50 S.littoralis

---

CL50 P.brassicae

10 dans lequel "CL50" représente la concentration léthale tuant 50% des larves en 72 heures.

L'utilisation d'un tel indice permet d'évaluer l'activité des souches bactériennes étudiées sans avoir à considérer le taux d'expression des polypeptides.

15 Les résultats obtenus, qui sont rapportés dans les exemples qui suivent, et les valeurs de DL 50 qui en sont déduites, ont montré que les souches bactériennes modifiées selon l'invention présentent une activité毒ique vis-à-vis de S.littoralis plus spécifique que les 20 protéines de cristal natives des souches azawai 7-29 ou berliner 1715.

L'invention vise donc l'application, pour l'élaboration de compositions larvicides toxiques de préférence vis-à-vis de S.littoralis, de ces souches modifiées, de vecteurs recombinants renfermant les 25 séquences nucléotidiques définies plus haut, en particulier du plasmide pHT671 et du plasmide pHT71, et de ces séquences elles-mêmes.

Les compositions larvicides de l'invention sont 30 alors caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace de polypeptides tels que définis ci-dessus ou exprimés par les séquences nucléotidiques évoquées plus haut.

Pour produire ces polypeptides on met avantageusement en oeuvre les gènes tronqués de δ-endotoxine

correspondant aux séquences nucléotidiques de l'invention.

5 Ces gènes peuvent être utilisés pour produire en excès le polypeptide toxique dans des microorganismes permettant l'expression des vecteurs recombinants ci-dessus. Des souches de microorganismes appropriées comprennent E.coli ou encore B.subtilis.

10 Ces gènes tronqués peuvent être réintroduits dans les souches de B.thuringiensis ou dans des espèces apparentées telle que B.cereus, selon les techniques classiques, par exemple, par transformation, conjugaison ou transduction. Ces techniques permettent de produire le polypeptide toxique en grande quantité sans avoir à modifier au préalable la région naturelle du promoteur 15 des gènes de  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis.

Cette transformation peut être effectuée en utilisant des méthodes dérivées de la transformation des protoplastes de B.subtilis selon (11) ou des cellules végétatives de B.thuringiensis comme décrit dans (12).

20 L'introduction de plasmides recombinants par un système de type conjugaison, peut être réalisée en utilisant B.thuringiensis comme souche hôte et B.subtilis ou Streptococcus faecalis comme souches de type donneur, en opérant selon (13) et (14).

25 En variante, les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences. L'introduction peut être effectuée dans des microorganismes tels que Pseudomonas en opérant selon 30 le procédé décrit dans (17), par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques contenant le transposon Tn5 et le gène de la toxine, ou Azospirillum ou Rhizobium par l'intermédiaire de vecteurs suicides dérivés du plasmide 35 RP4 et de plasmides mobilisateurs fonctionnels chez les

bactéries gram négatives (pRK2013 par exemple) selon les procédés décrits dans (18).

Les gènes tronqués sont seuls dans les souches de Bacilli, ou en variante sont associés à différents gènes de  $\delta$ -endotoxine ce qui permet d'obtenir des cristaux synthétisés par ces souches spécifiquement toxiques, vis-à-vis d'espèces données de Noctuelles, ou toxiques à la fois vis-à-vis des Noctuelles et d'insectes sensibles aux autres  $\delta$ -endotoxines. Ces recombinaisons, effectuées 5 in vitro ou in vivo avec les séquences nucléotidiques de l'invention et d'autres gènes de  $\delta$ -endotoxines présentant des spécificités toxiques différentes, conduisent à la construction de nouveaux gènes codant pour de nouvelles 10 protéines toxiques hybrides présentant un large spectre d'activité vis-à-vis des insectes. Ces nouveaux gènes et 15 ces nouvelles protéines entrent également dans le cadre de l'invention.

Dans ces applications, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être transférées et exprimées dans des plantes sensibles à S.littoralis 20 afin de diminuer les ravages causés par ces insectes.

Parmi les plantes à protéger, on citera : le coton, le trèfle, la tomate et la luzerne.

Le transfert du gène tronqué dans des plants de coton, peut être réalisé par transformation mettant en 25 jeu des souches telles que Agrobacterium comme décrit dans (15).

L'invention concerne en outre les cellules végétales, les plantes et les graines renfermant les 30 séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Les cellules végétales selon l'invention sont des cellules dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que 35

définie ci-dessus. L'invention concerne également les cellules végétales issues de leur division.

Les plantes selon l'invention sont des plantes transformées par un procédé non essentiellement biologique, ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, capable d'exprimer un polypeptide毒ique vis-à-vis de S.littoralis. Il s'agit aussi de plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication ou de croisements hybrides.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide毒ique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans leur génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

L'invention vise en outre des graines capables de donner une plante telle que définie ci-dessus ou issues d'une telle plante, caractérisées en ce qu'elles ont intégré dans leur génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotide décrite plus haut.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se reportant aux exemples dans lesquels :

- la figure 1 représente la carte de restriction des plasmides pHTA6 et pHTE6,
- la figure 2, la carte de restriction d'un gène d'une protéine de cristal de la souche aizawai 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2 et définissant les fragments d'ADN qui sont utilisés comme sonde,
- la figure 3, présente le fragment de 6,6kb cloné dans

pHTA6 et le résultat d'une hybridation effectuée entre ce fragment et les sondes décrites dans la figure 2,

- la figure 4, la carte de restriction du plasmide pHT671, et

5 - la figure 5, les photographies de tests d'immunodiffusion.

Les expériences d'hybridation réalisées pour la mise en oeuvre de l'invention ont été effectuées à 42°C pendant 24 h. dans une solution contenant 5 x SSC, 30% de 10 formamide et 1 Denhardt (7) en présence de la sonde ADN marquée au <sup>32</sup>P. Les filtres sont lavés à 42°C, 20 mn, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 x SSC dans 30% de formamide, 5 x SSC, 2 x SSC, 1 x SSC et 0,5 x SCC avant séchage à température ambiante.

15 EXEMPLE I - Construction d'une séquence d'ADN de 3kb environ contenant un gène chimère d'une toxine insecticide

Cette construction comprend :

20 1/ la préparation de banques de gènes de B.thuringiensis  
2/ la sélection et la caractérisation des clones transformants renfermant les gènes d'une protéine du cristal et des séquences nucléotidiques responsables de l'activité larvicide,

25 3/ recombinaison in vitro de ces séquences dans un vecteur de clonage avec construction du plasmide pHT671.

Ces différentes étapes sont réalisées comme suit :

1/ Préparation de banques de gènes de B. thuringiensis.

30 L'ADN total des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01 de Bacillus thuringiensis est purifié en utilisant la méthode rapportée dans (1) et 50µg de chaque ADN purifié sont complètement digérés avec l'enzyme de restriction PstI.

L'ADN digéré par PstI est analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et des fragments d'ADN d'une taille de 5 à 8 kb sont récupérés à partir des gels d'agarose, par électroélution, de la manière décrite dans (2).

5 Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche aizawai 7-29 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC18 digéré par PstI selon (3).

10 Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la chaîne entomocidus 6-01 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC9 digéré par PstI. Les cellules de E.coli JM83 sont transformées avec le mélange de ligature comme décrit dans (4).

15 Les clones transformants de E.coli sont sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

2/ Isolement et caractérisation des clones transformants contenant les gènes d'une protéine de cristal.

A/ Criblage des cellules de E.coli transformées à 20 l'aide d'un fragment interne d'un gène de la protéine du cristal marqué au <sup>32</sup>P, utilisé comme sonde :

25 Des clones transformants contenant des plasmides recombinants portant le gène du cristal sont détectés par hybridation sur colonies, suivant la méthode décrite dans (5), en utilisant comme sonde un fragment PvuII de 2 kb du plasmide pBT 15-88 correspondant à une partie interne du gène de la protéine du cristal, situé sur le chromosome de la souche berliner 1715.

B/ Caractérisation des plasmides recombinants présents dans les clones qui réagissent avec la sonde ci-dessus.

Deux plasmides recombinants, pHTA6 et pHTE6, isolés respectivement des banques de gènes construites à

partir des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, présentent une homologie avec cette sonde. Dans chaque cas, un fragment d'ADN d'environ 6,6 kb a été cloné.

La carte de restriction des deux plasmides est 5 donnée sur la figure 1. La comparaison des sites de restriction montre que les deux fragments d'ADN clonés semblent identiques.

Afin de délimiter les séquences correspondant au gène de la  $\delta$ -endotoxine, différents fragments d'ADN 10 marqués au  $^{32}\text{P}$ , provenant d'un gène du cristal précédemment caractérisé, et cloné dans le plasmide recombinant pHTA2, sont utilisés comme sondes. Ce dernier gène du cristal également originaire de la souche aizawai 7-29 code pour une protéine de 130 kd active contre P. bras-15 sicae mais pas contre S. littoralis. Ce type de gène possède la même carte de restriction que le gène de la  $\delta$ -endotoxine issu de la souche berliner 1715. Sur la figure 2, on a rapporté la carte de restriction de ce 15 gène de la protéine du cristal de la souche de aizawai 7-29 cloné dans le plasmide pHTA2. Les traits épais 20 indiqués au-dessus de la carte correspondent aux fragments utilisés comme sondes d'hybridation.

Les plasmides pHTA6 et pHTE6 sont hydrolysés 25 par différentes endonucléases de restriction, analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et hybridés avec les différentes sondes.

Le transfert de l'ADN sur des filtres de nitro-cellulose est réalisé suivant la méthode de SOUTHERN décrite dans (6). L'hybridation est conduite à 42°C pendant 30 24 heures dans une solution contenant : 5X SSC, 30% de formamide et un mélange 1X Denhardt décrit dans (7) en présence d'une sonde d'ADN marquée au  $^{32}\text{P}$ . Les filtres sont ensuite lavés à 42°C pendant 20 minutes, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 SSC 35 dans 50% de formamide, 5 SSC, 2 SSC, 1 SSC et 0,5 SSC

avant d'être séchés à la température ambiante.

Les résultats de ces expériences d'hybridation sont résumés sur la figure 3. Il apparaît que chaque extrémité des fragments d'ADN de 6,6 kb clonés présente 5 une homologie avec les sondes. Le fragment PstI-KpnI de 1,5 kb réagissant avec la sonde n° 3 correspond à l'extrémité 3' d'un gène de la protéine du cristal présent à la fois dans les souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01. Comme il est indiqué sur la figure 3, les sondes n° 10 1 et n° 2 correspondant à l'extrémité 5' du gène de la  $\delta$ -endotoxine de pHTA2, s'hybrident avec le fragment HindIII-HincII de 1,1 kb contenu dans le plasmide pHTA6. La sonde n° 3 qui couvre l'extrémité 3' du gène de la  $\delta$ -endotoxine de pHTA2, s'hybride avec le fragment 15 HindIII-PstI de 0,4kb contenu dans le plasmide pHTA6. Il doit être noté qu'un faible signal d'hybridation est obtenu avec la sonde n° 2 alors que les deux autres sondes donnent des signaux facilement détectables.

A partir de ces résultats, les inventeurs ont 20 établi que le fragment d'ADN HindIII-PstI de 3 kb correspond à une grande partie d'un gène de la  $\delta$ -endotoxine qui commence près du site HindIII central. Il apparaît clairement au vu des résultats des expériences d'hybridation que le gène de la  $\delta$ -endotoxine présente des différences substantielles avec ceux caractérisés dans l'art 25 antérieur. Sur la base de ces résultats il a été décidé de cloner le fragment de 3 kb HindIII-PstI dans le vecteur pUC9.

3/ Construction du plasmide pHT 671 contenant un gène chimère de la toxine insecticide reconstitué.

Le fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb issu du plasmide pHTA6 et le fragment d'ADN HincII-PstI de 1,9kb issu du plasmide pHTA6 sont purifiés sur gels d'agarose.

Des quantités égales des deux fragments d'ADN purifiés et de l'ADN de pUC9 digéré avec HindIII et PstI sont mélangées et ligaturées. Le mélange de ligature est utilisé pour transformer des cellules compétentes de 5 E.coli JM83, puis les cellules transformées de E.coli sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline. L'un des clones recombinants intéressant examiné contient un plasmide désigné par pHT671, dont la carte de restriction a été déterminée et est représentée sur la 10 figure 4. Ce plasmide (pHT671) contient un fragment d'ADN de 3 kb inséré dans le vecteur pUC9. Cette séquence d'ADN a la même carte de restriction que les fragments HindIII-PstI de 3 kb contenus dans les plasmides pHTA6 et pHTE6, mais correspond à une molécule d'ADN reconstituée 15 construite par recombinaison in vitro à partir de séquences d'ADN provenant des souches aizawai 7-29 d'une part et entomocidus 6-01 d'autre part.

EXEMPLE II : Etude de la séquence nucléotidique de la région du promoteur et de la région codant pour la partie 20 NH<sub>2</sub> terminale de la  $\delta$ -endotoxine active contre les Noctuidae.

Le fragment HindIII-HincII de pHT671 est séquencé conformément à la méthode décrite dans (8) en utilisant un système M13. Pour obtenir des fragments 25 d'ADN clonés se chevauchant partiellement qui seront utilisés dans le séquençage de l'ADN, on a recours à la méthode de sous-clonage par délétion dans M13, développée par DALE et al (9).

La séquence de 940 nucléotides du fragment 30 HindIII-HincII qui est d'une longueur d'environ 1 kilobase correspond à l'enchainement I ci-dessus.

L'analyse de cette séquence montre que la plus grande phase ouverte de lecture commence à la position 241 et qu'un site potentiel de liaison aux ribosomes 35 GGAGG se trouve six paires de base en amont de ce codon

ATG (position 230 à 235). La région localisée entre les nucléotides 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon ATG) est fortement homologue à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 5 Dipel (BTK) séquencée par WONG et al (1983) et décrite dans (16) et dont les auteurs ont montré qu'elle contient trois promoteurs *BtI*, *BtII*, et *Ec* fonctionnels dans *B.thuringiensis* et *E.coli* respectivement. La comparaison entre les séquences en acides aminés déduites des 750 10 premiers nucléotides des gènes de BTK et pHT671, montre que ces polypeptides présentent des différences significatives au niveau de la moitié N-terminale de la partie active issue de la protoxine (seulement 66% d'homologie stricte). Il est important de noter que c'est 15 la première fois qu'un gène de la δ-endotoxine isolé à partir d'une souche active contre les lépidoptères code pour un polypeptide qui présente des différences substantielles dans cette région. En effet, ce domaine N-terminal apparait fortement conservé (plus de 97% d'homologie stricte) parmi tous les gènes du cristal actifs sur lépidoptères qui ont été séquencés jusqu'à présent. Par ailleurs, les inventeurs ont montré que le taux de variabilité est du même ordre si l'on considère les séquences nucléotidiques de pHT671 et des autres gènes de type 20 lépidoptères. 25

EXAMPLE III : Construction d'une séquence d'ADN de 2,7kb environ contenant un gène d'une toxine larvicide.

Pour réaliser cette construction on a utilisé l'ADN de la souche *aizawai* 7.29 de *B.thuringiensis* 30 jusqu'à l'étape de réalisation du plasmide pHTA6 telle que décrite dans l'exemple I.

Le fragment HindIII-PstI d'environ 2,7kb obtenu à partir du plasmide pHTA6 a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC9, préalablement hydrolysé par les enzymes 35 de restriction HindIII-PstI, pour donner le plasmide pHT71.

EXEMPLE IV : Etude de la séquence de nucléotides constituant le plasmide pHT71 codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

5 Le fragment HindIII-Pst-I de 2,7kb de pHTA6, qui a été sous-cloné dans pHT71, a été séquencé par la technique de Sanger et al.(8) en utilisant le phage M13mp19 et le système de sous-clonage par délétions développé par Dale et al(9). Ce système permet d'obtenir 10 des phages M13 contenant une série de fragments d'ADN se chevauchant partiellement et qui peuvent être utilisés pour le séquençage de l'ADN.

La séquence de nucléotides de ce fragment de 2,7kb qui correspond à l'enchaînement (III) donné ci-dessus, a été déterminée sur les 2 brins d'ADN, exception 15 faite des 212 derniers nucléotides (position 2500 à 2711) qui n'ont été séquencés que sur 1 seul brin.

La séquence nucléotidique de ce fragment Hind-III-PstI a une longueur de 2711 nucléotides. Ce 20 fragment contient le promoteur potentiel ainsi que la plus grande partie du gène de la  $\delta$ -endotoxine active sur S.littoralis.

EXEMPLE V : Etude de la toxicité spécifique des clones recombinants de E.coli JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) contre S.littoralis.

La toxicité des clones recombinants de E.coli JM83 contenant pHT671 et de E.coli JM83 contenant pHT71 a été déterminée par des tests biologiques sur des chenilles de l'espèce P.brassicae et S.littoralis comme décrit par LECADET et MARTOURET dans (10). Les résultats 30 ont été comparés avec la toxicité spécifique des protéines de cristal natives et purifiées à partir des souches berliner 1715 et aizawai 7-29 entomocidus 6.01 B cereus 569 (contenant le plasmide pBT45, pAM81) contre 35 les deux espèces d'insectes. La toxicité spécifique du clone recombinant et des souches de B.thuringiensis est

32

exprimée en termes d'"indice de spécificité" défini précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 1 ci-après.

5 Dans ce tableau, pour des souches de E.coli, la concentration 1 correspond à une culture bactérienne de 14 heures concentrée 20 fois, désintégrée par ultrasons ; pour les souches de B.thuringiensis la concentration est exprimée en  $\mu$ g de protéine cristal par  $\mu$ l de préparation.  
10 L'activité toxique des préparations a été testée par ingestion forcée sur des chenilles au cinquième stade de développement avec 5  $\mu$ l de préparation, ou par une technique d'ingestion libre en utilisant des larves au deuxième stade de développement.

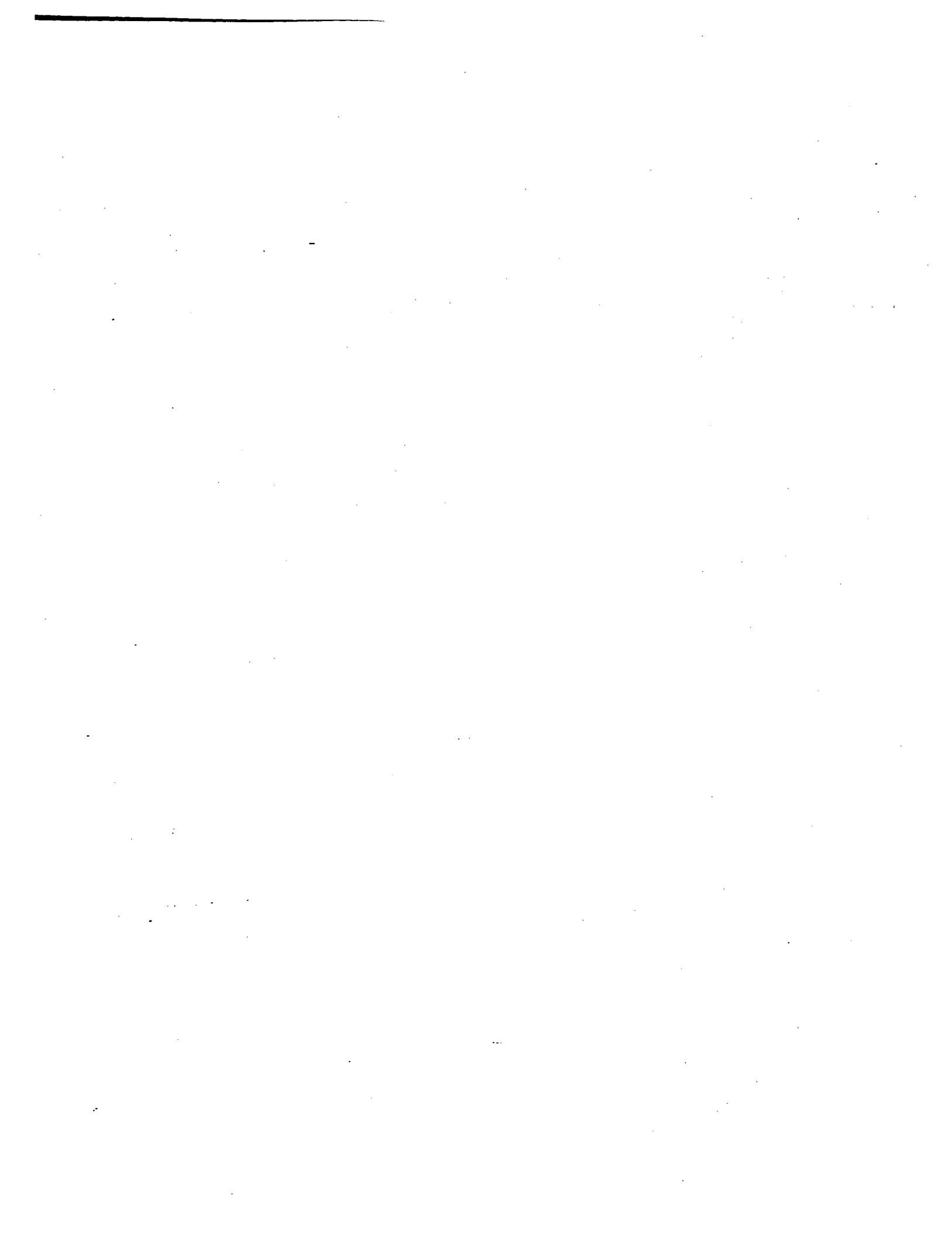
15

20

25

30

35



## TABLEAU 1

Toxicité comparée d'un clone recombinant et de deux souches de B.thuringiensis vis-à-vis de S.littoralis et P.brassicae.

5	Souches et plasmides	S.littoralis		P.brassicae		Indice de spécificité CL50 S.littoralis CL50 P.brassicae
		CL50 2ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire		
10	JM83 (pUC18)	> 1	> 1	> 1		-
	JM83 (pHT671)	0,04	0,13	0,72		0,2
	JM83 (pHTA2)	> 1	> 1	0,03		> 30
15	JM83 (pHTA4)	> 1	> 1	> 1		-
	JM83 (pHT71)	ND	0,5	> 1		< 0,5
	<u>berliner 1715</u> cristaux natifs	ND	0,11	0,007		15,7
20	<u>aizawai 7.29</u> cristaux natifs	ND	0,02	0,04		0,5
	<u>entomocidus 601</u> cristaux natifs	ND	0,028	0,012		2,3
25	<u>B.cereus 569</u> (pBT45,pAM $\beta$ 1)	ND	0,38	0,054		7

L'examen des valeurs de CL50 résumées dans ce tableau 1 montre que les extraits de protéine des clones recombinants JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont préférentiellement toxiques contre S. littoralis. En second 5 lieu une comparaison des valeurs de l'indice de spécificité montre que l'activité larvicide des clones recombinants est plus spécifique à raison de 2,5 fois envers S. littoralis que les protéines du cristal natives de la souche aizawai. Par ailleurs, les clones recombinants 10 de JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont très actifs contre un autre insecte de la famille des Noctuidae, Mamestra brassicae (pour le clone JM83 (pHT671) par exemple, la valeur CL50 est de 0,02, en utilisant des larves du deuxième stade de développement).

15 Ces deux résultats montrent que le gène de la toxine larvicide construit et cloné dans les plasmides pHT671 et pHT71 code pour une protéine spécifiquement active contre S. littoralis.

20 D'autres préparations obtenues à partir de clones recombinants contenant des plasmides portant des gènes codant pour d'autres types de δ-endotoxines (pHTA2 et pHTA4) ne sont pas actives sur S. littoralis : on peut voir que le plasmide pHTA2 code pour une δ-endotoxine spécifiquement active sur P. brassicae alors que le plasmide pHTA4 code pour une δ-endotoxine dont l'insecte 25 cible n'a pas encore été identifié. On peut également voir que les inclusions cristallines produites par une souche de Bacillus cereus qui a reçu le plasmide pBT45, un des plasmides de la souche aizawai 7-29 qui porte aussi un gène de δ-endotoxine (le gène d'origine 30 plasmidique de la souche aizawai 7-29), sont également spécifiquement actives sur P. brassicae.

Des résultats similaires sont obtenus en utilisant, à la place des extraits bactériens bruts, des 35 extraits protéiques solubles préparés à partir de

différents clones recombinants de E.coli.

Sur la base des valeurs de la CL50 rapportées dans le tableau ci-dessus et d'un poids individuel moyen de 41 mg par larve L5 (cinquième stade larvaire) de S.littoralis, la valeur de la DL50 a été estimée à 2,4 $\mu$ g/gramme de larve pour les cristaux natifs de la souche aizawai 7-29.

Sur ces mêmes bases et sur la base de facteurs d'équivalence permettant de passer de la masse bactérienne totale à la quantité de protéines spécifiques (2% environ des protéines totales chez E.coli JM83 (pHT671), la DL50 correspondant à la toxine produite par l'expression chez E.coli JM83 du gène selon l'invention cloné dans le plasmide pHT671, a été déterminée et estimée à une valeur proche de 5,5 à 6  $\mu$ g/gramme de larve.

Sur ces mêmes bases et après détermination de la CL50 d'extraits protéiques solubles préparés à partir de cultures broyées de E.coli JM83 (pHT671), la valeur de la DL50 correspondant à la toxine présente dans ces extraits a été estimée à 4,15  $\mu$ g/gramme de larve.

Dans les deux cas et particulièrement dans le cas des broyats de E.coli, les valeurs de DL50 calculées sont approximatives et supérieures à celle des cristaux natifs, puisqu'il ne s'agit pas de toxine purifiée. Cependant ces données indiquent sans ambiguïté que le gène exprimé par pHT671 détermine une  $\delta$ -endotoxine présentant la spécificité vis-à-vis de S.littoralis. En effet, le même type d'estimation réalisé avec des extraits de E.coli JM83 (pHTA2) portant un gène de  $\delta$ -endotoxine de spécificité différente conduit à des valeurs 30 à 50 fois supérieures de la DL50 des extraits solubles, vis-à-vis de S.littoralis (135 à 350  $\mu$ g/gramme de larve).

Les données qui précèdent permettront aisément à l'homme de l'art d'élaborer des compositions larvicides

36

actives avec les protéines de l'invention.

D'autres expériences de toxicité ont été réalisées en utilisant des larves au deuxième stade larvaire de M. brassicae, S. frugiperda et S. littoralis.

5 Les résultats obtenus, exprimés en termes de LC 50 comme défini pour le tableau 1, sont donnés dans le tableau 2.

10

15

20

25

30

35

TABLEAU 2  
 ACTIVITÉ DES CLONES RECOMBINANTS  
 CONTRE LES LARVES D'INSECTES  
 DE LA FAMILLE DES NOCTUINAE  
M. BRASSICAЕ, S. FRUGIPERDA AND S. LITTORALIS

LARVE D'INSECTE ET STADE	<u>M. BRASSICAЕ</u>		<u>S. FRUGIPERDA</u>		<u>S. LITTORALIS</u>	
	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE
JM 83 (pUC18)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
JM 83 (pHTA2)	> 1	0,51	0,51	0,51	0,9	0,9
JM 83 (pHT671)	0,02	0,5	0,5	0,5	0,03	0,03
JM 83 (pHT71)	ND	ND	ND	ND	0,03	0,03
JM 83 (pHTA4)	> 1	0,54	0,54	0,54	> 1	> 1

Il ressort de l'examen du tableau 2 que les extraits bactériens bruts du clone recombinant JM83 (pHT671) sont toxiques vis-à-vis de M brassicae et de S littoralis (les valeurs de CL50 sont respectivement de 5 0,02 et 0,03) et faiblement toxiques vis-à-vis de S fruiperda (CL50 de 0,5).

Les extraits du clone recombinant E.coli JM83 (pHTA2) sont faiblement actifs à l'égard de S fruiperda et de S littoralis et pas du tout toxique à l'égard de 10 M brassicae. Les extraits du clone recombinant JM83 (pHTA4) ne sont pas toxiques vis-à-vis de M brassicae et de S littoralis et sont faiblement toxiques à l'égard de S fruiperda.

Ces résultats confirment la forte toxicité 15 spécifique des protéines obtenues à partir de pHT71 et de pH671 à l'égard de S littoralis et montrent que cette classe de protéine de cristal est aussi très active à l'égard de M brassicae.

EXEMPLE VI : Etude de la spécificité des polypeptides exprimés par les clones formés par introduction des plasmides pHT671 et pHT71 dans E.coli.

Cette étude a été réalisée grâce à des tests d'immuno-diffusion. Les résultats sont rapportés sur la figure 5 (qui comprend les figures 5A et 5B).

25 La mise en oeuvre de l'expérience d'immuno-diffusion a été réalisée conformément au protocole suivant :

Des extraits solubles de protéines de clones E.coli contenant les plasmides pHT671, pHTA4, pHTA2 ou 30 pHT71, pUC18 ont été placés respectivement dans les puits n° 2, 3, 4, 5, 6. Un échantillon d'un cristal purifié solubilisé de aizawai 7-29 a été placé dans le puits n° 1 afin de servir de contrôle positif.

Dans le test rapporté sur la figure 5A un

antisérum contre toutes les  $\delta$ -endotoxines de aizawai 7.29, contenant des anticorps de lapin dirigés contre les protéines du cristal solubilisées a été utilisé et placé dans le puits central.

5 Une ligne d'immunoprecipitation a été observée dans tous les cas excepté dans le cas de l'extrait de E.coli contenant le vecteur plasmidique seul (puits n° 6).

10 On a remarqué que les lignes d'immunoprecipitation issues des puits n° 4 et n° 5 croisent, ce qui montre que les produits codés par les plasmides pHTA2 et pHT71 respectivement présentent des déterminants antigéniques différents.

15 Dans le test rapporté sur la figure 5B, l'antiserum utilisé contenait des anticorps polyclonaux de lapin contre les protéines du cristal de berliner 1715.

20 Une ligne d'immunoprecipitation a été observée avec les extraits de E.coli JM83 (pHTA4) (puits n° 3) JM83 (pHTA2) (puits n° 4). En revanche les clones E.coli JM83 (pHT71) (puits n° 5) JM83 (pHT671) (puits n° 2) ou JM83 (pUC9) (puits n° 6) ne donnent pas d'immunoprecipitation.

25 On peut en déduire que les gènes du cristal isolés dans pHTA4 et pHTA2 expriment des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de berliner 1715, souche qui n'est pas spécifiquement active vis-à-vis de S.littoralis.

30 En revanche, les extraits bruts de E.coli contenant les plasmides pHT671 et pHT71 contiennent des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de la souche aizawai 7.29, qui ne sont pas liés sur le plan immunogène avec les protéines du cristal de la souche berliner 1715.

35 Ces résultats confirment ceux donnés précédemment en rapport avec la spécificité des gènes isolés dans

40

les plasmides pHT71 et pHT671.

Des essais de précipitation antigène-anticorps ont permis de déterminer le niveau d'expression des gènes de  $\delta$ -endotoxine dans différents clones recombinants.

5 Les résultats obtenus ont montré que la protéine du cristal représente entre 7 et 10% de protéines cellulaires totales de E.coli JM83 (pHTA2), entre 2 et 3% dans E.coli JM83 (pHT671) et entre 0,5 et 1% dans E.coli JM83 (pHTA4) et E.coli JM83 (pHT71).

10

15

20

25

30

35

Les références bibliographiques dont il est question dans les exemples sont les suivantes :

(1) KLIER, T.A.F., LECADET, M-M. and DEJONDER, R., 1973, Sequential modifications of RNA polymerase during sporogenesis in Bacillus thuringiensis, Eur. J. Biochem., 36 : 317-327.

(2) MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York

(3) VIEIRA, J. and MESSING, J., 1982, The pUC plasmids, and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, Gene, 19 : 259-268.

(4) LEDERBERG, E.M. and COHEN, S.N., 1974, Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol., 119 : 1072-1074.

(5) GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D.S., 1975, Colony hybridization, a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72 : 3961-3965.

(6) SOUTHERN, E.M., 1975, Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Molec. Biol., 98, 503-517.

(7) DENHARDT, D.T. 1976, A membrane filter taking for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm., 23 : 641-646.

(8) SANGER, F., NICKLENS, S. and COULSON, A.R., 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 5463-5467.

(9) DALE et al. (1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA, Plasmid 1985, 13 : 31-40

(10) LECADET, M.M. et MARTOURET D. 1987, Host specificity of the Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin toward

Lepidopteran species : Spodoptera littoralis BdV and Pieris brassicae L. J. of Invert. Pathol., 49 (n° 1) : 37-48.

5 (11) CHANG - et al., 1979, High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA- Mol Gen Genet 168:111 115

(12) HEIERSON et al., 1987, Transformation of vegetative cells of Bacillus thuringiensis by plasmid DNA, Journal of Bacteriology, Mar. 1987, p.1147-1152,

10 (13) KLIER et al., 1983, Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes, Mol Gen Genet (1983) 191:257 262

15 (14) LERECLUS et al., 1983, Isolation of a DNA, sequence related to several plasmids from Bacillus thuringiensis after a mating involving the Streptococcus faecalis plasmid pAMB1, Mol Gen Genet (1983) 191:307-313

(15) UMBECK et al., 1987, Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum L.) plants - Biotechnology vol.5 March 1987.

20 (16) WONG et al., 1983, transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. of Biol. Chem., 258 : 1960-1967.

(17) OBUKOWICZ M. et al (1986).  $Tn^5$  mediated integration of the  $\delta$ -endotoxin gene from B. thuringiensis into the 25 chromosome of root colonizing Pseudomonas. J. Bacteriol., 168, 982-989.

(18) SIMON, R. et al, (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology, 1, 30 pp. 784-791.

(19) Schnepf et al, (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J BIOL Chem 260 : 6264-6372.

(20) Adang et al, (1985) Characterized full-length and 35 truncated plasmid clones of the crystal protein of

43

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36 : 289-300.

5 (21) Wabiko et al, (1986) Bacillus thuringiensis entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA 5 : 305-314.

(22) Hofte et al, (1986) Structural and functional analysis of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis berliner 1715. Eur J Biochem 161 : 273-280.

10 (23) Shibano et al, (1986) Complete structure of an insecticidal crystal protein gene from Bacillus thuringiensis. In : Bacillus molecular genetics and biotechnology applications. J. Ganesan, A.T., Hoch, J.A. (eds). Academic Press 307-320.

15 (24) Oeda et al, (1987) Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of Bacillus thuringiensis strain aizawai IPL7 and its high-level expression in Escherichia coli. Gene 53 : 113-119.

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1/ Séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S. littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S. littoralis.

5 2/ Séquence de nucléotides de 3 kb environ correspondant au fragment de restriction HindIII-PstI provenant de B. thuringiensis capable de s'hybrider avec les sondes 1, 2, 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2.

15 3/ Séquence selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comporte des sites dans l'ordre suivant :  
Hind III - Hinc III - Bgl II - Kpn I - Hind III - Pst I -

4/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque 20 des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue in vitro à partir d'une souche unique de B. thuringiensis.

5/ Séquence de nucléotides selon la revendication 4, caractérisée en ce que la souche de B. thuringiensis 25 est la souche aizawai 7.29.

6/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN de deux souches différentes de B. thuringiensis.

30 7/ Séquence selon la revendication 6, caractérisée en ce que les 2 souches de B. thuringiensis correspondent respectivement aux souches entomocidus 6-01 et aizawai 7-29.

8/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce 35 qu'elle code pour un polypeptide capable de former un

45

complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

9/ Séquence de nucléotides caractérisée en ce  
5 qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée  
à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement  
suivant :

10

15

20

25

30

35

52  
GTC TAC TTG ACA GGG GTC GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GGG GCA TAT ATT GAT  
112  
ATT TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA  
172  
TCC TGG TAA TGA AAA ACA GTC TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA ATA AAA AAA CGG  
232  
AGC TAT TTT ATG GAG CAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT  
292  
CCT CAA GAA GTC CTT TTG GAT GCA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT  
352  
TCT CTG TCA CTT CTT CAG TTT CTG GTC TCT AAC TTT GTC CCA CGG GCA GCA TTT TTA GTC  
412  
CCA TTA ATA GAT TTT GTC TGG CGA ATA CTT CGC CCT TCT CAA TGC GAT CGA TTT CTC CTA  
472  
CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT AGC AAT GCT GCT ATT CCT  
532  
AAT TTA GAA CGA TTA CGA AAC AAT TTC ATT ATA TAT GTC CGA CGA TTT AAA CGA TGG CGA  
592  
CGA GAT CCT AAT AAT CGA CGA ACC AGC ACC AGA CTC ATT GAT CGC TTT CCT ATA CTT GAT  
652  
CGG CTC CTT CGA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT CGA TTT CGA GTC CGC CTT TTA  
712  
TCC CTT TAT GCT CGA CGG CGC AAT CTG CAT CTC GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTC ATT TTT  
772  
CGA CGA AGA TGG CGA TTG ACA AGC ATA AAT GTC AAT CGA AAC TAT AAT AGA CTC ATT AGC  
832  
CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT CAC TGT CGA AAT AGC TAT AAT CGG CGA TTA AAT AAT TTA  
892  
CGC AAA TCT AGC TAT CGA GAT TGG ATA AGA TAT AAT CGA TTA CGG AGA GAC TTA AGA TTG  
952  
ACT GTC TTA GAT ATC CGC CCT TTC TTT CGA AAC TAT GAC

cu à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :







50

10/ Séquence de nucléotides codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S. littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement (I) ou (III) défini à la revendication 9.

11/ Séquence de nucléotides selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle présente un codon d'initiation ATG situé en position 241.

10 12/ Séquence selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée par un site de liaison aux ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

15 13/ Séquence selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence comprise entre les nucléotides en position 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon d'initiation ATG) qui est homologue à raison d'environ au moins 70% à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki-HD1 Dipel (BTK) qui contient les trois promoteurs BtI, BTII et Ec fonctionnels dans B. thuringiensis et E. coli respectivement.

20 14/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (II) d'acides aminés ci-après :

25

30

35

MET GLU GLU ASH ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN  
PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE  
SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL  
GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL  
GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA  
ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU  
GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP  
GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU  
SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE  
GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG  
HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU  
PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU  
THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

ou qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV)  
d'acides aminés ci-après :



二

53

1111  
1981  
PCT ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PRO GLY GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU ILE ILE ASP ILE  
GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PRO GLU ALA GLU SER ASP LEU GLU PRO GLN GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PRO THR SER SER ASN  
2071  
GLN ILE GLY LEU LYS IMA ASP VAL IMA ASP IYR HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP  
2251  
GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER GLU GLU LEU ASN ASP PRO ASN PHE ARG GLY GLY ILE  
2341  
ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TAP ARG GLY GLY SER IMA ASP ILE ILE GLN GLY GLY ASP ASP VAL PHE LYS GLU ASN PHE VAL IMA LEU  
2431  
PRO GLY IMA VAL ASP GLU CYS TYR PRO IMA TYR LEU TYR GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR ARG TYR GLU LEU ARG  
2521  
GLU IMA ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER  
2611  
LEU TAP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TAP ASN PRO ASP LEU ASP  
2701  
CYS SER CYS

15/ Vecteur recombinant d'expression et de clonage comportant au moins une partie de la séquence nucléotidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14.

5 16/ Plasmide selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il s'agit de pHT671 tel que représenté sur la figure 4, ou de pHT71 comprenant un fragment d'ADN HindIII-PstI constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

10 17/ Souches bactériennes modifiées, caractérisées en ce qu'après transformation elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 14.

15 18/ Souche bactérienne selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un vecteur recombinant selon la revendication 15 ou 16,

19/ 20/ Polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

25 20/ Polypeptide selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (II) ou la séquence (IV) d'acides aminés définies dans la revendication 14.

21/ 30/ Procédé d'obtention d'une séquence nucléotidique codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé par les étapes suivantes :

- la réalisation d'une hybridation entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis

active contre S.littoralis et d'autre part, une ou plusieurs séquences de nucléotides utilisées comme sondes provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène d'une  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis cette partie codant pour la partie N-terminale d'un polypeptide toxique vis-à-vis des lépidoptères et provenant de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,

- l'isolement du fragment,

- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

22/ Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène d'une  $\delta$ -endotoxine provenant d'une souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130kDa active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

23/ Procédé selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'au moins une séquence de nucléotides issue d'au moins un vecteur recombinant contenant une séquence de nucléotides d'au moins une souche de B.thuringiensis.

24/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins 2 souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis.

25/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape

de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant de la souche aizawai 7.29.

26/ Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment de restriction HincII-PstI provenant de la souche aizawai 7-29.

10 27/ Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le fragment de restriction recombiné selon la revendication 25 est porté préférentiellement par un plasmide pHTA6 et les fragments de restriction recombinés selon la revendication 26, HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés préférentiellement par les plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6, lesdits plasmides pHTA6 et pHTE6 étant tels qu'isolés à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotidiques issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

25 28/ Composition larvicide à activité préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace de polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 19 à 20 exprimé par les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 14, le vecteur selon la revendication 15, ou le plasmide selon la revendication 16, ou la souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18.

29/ Application des séquences de nucléotides selon 35 l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour produire

un polypeptide toxique vis-à-vis de lépidoptères, de préférence S.littoralis, dans des microorganismes capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences tels que E.coli, B.subtilis, B.cereus ou B.thuringiensis.

5 30/ Application selon la revendication 29, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes, tels que 10 Pseudomonas, Azospirillum ou Rhizobium et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences.

15 31/ Application selon la revendication 29 ou 30, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes en association avec différents gènes de  $\delta$ -endotoxine.

20 32/ Application des séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 à la transformation des plantes sensibles à S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend le transfert et l'expression 25 de ces séquences dans ces plantes.

33/ Cellules végétales dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14 et, cellules issues de leur division.

34/ 30 Plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, transformées par un procédé non essentiellement biologique, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis et,

59

plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication, ou de croisements hybrides.

35/ Plante ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères 5 génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide毒ique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans son génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

10 36/ Graine capable de donner une plante selon la revendication 34 ou 35 ou issue d'une telle plante, caractérisée en ce qu'elle a intégré dans son génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotides selon 15 l'une quelconque des revendications 1 à 14.

20

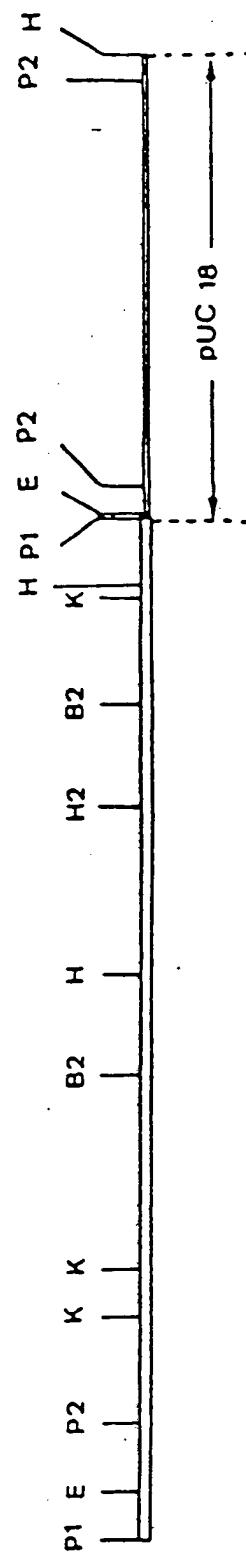
25

30

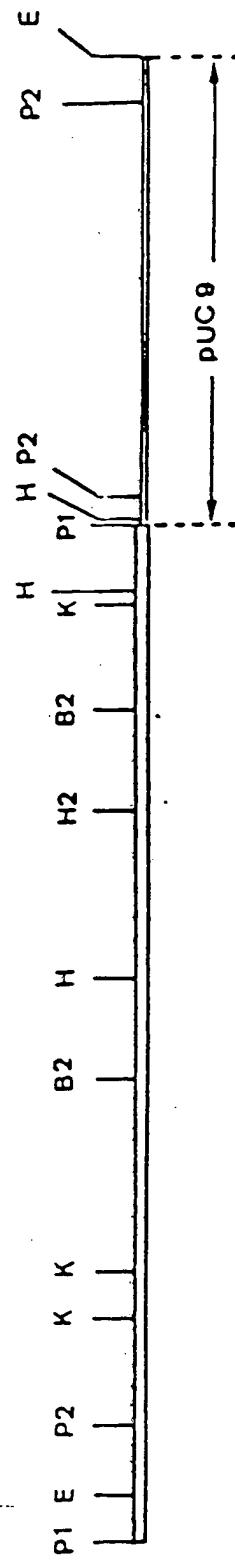
35

1/5

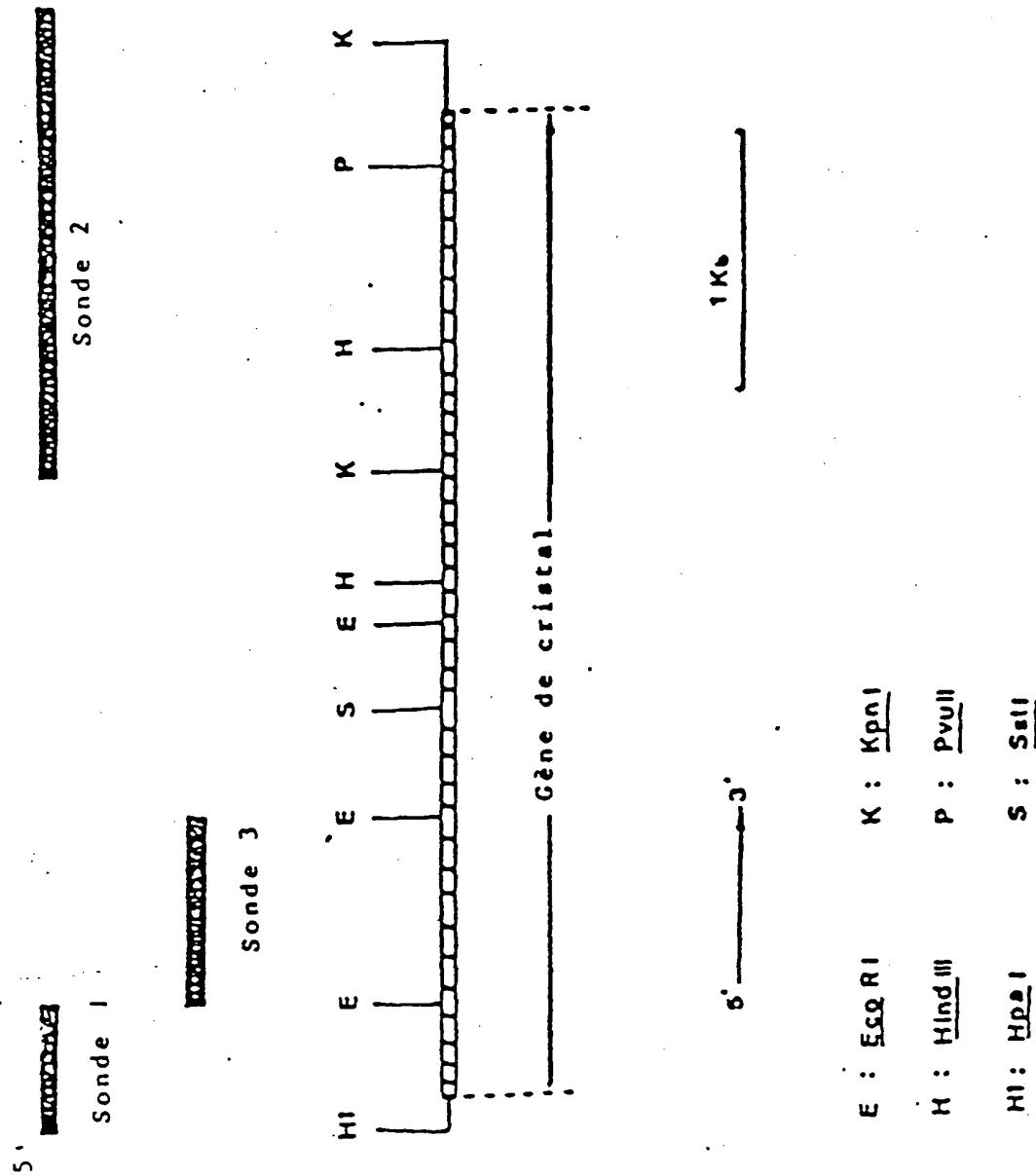
pHTA 6



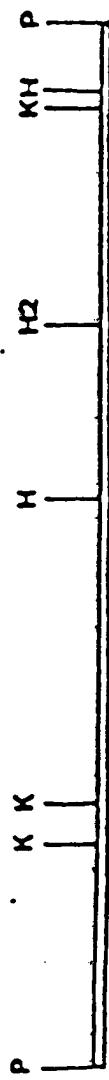
pHTE 6

B2 : Bgl IIE : Eco RIK : Kpn IP1 : Pst IP2 : Pvu IIH2 : Hinc IIH : Hind III

1Kb

FIGURE 2

3/5

FIGURE 3

Sonde 1

Borehole profile

Sonde 2

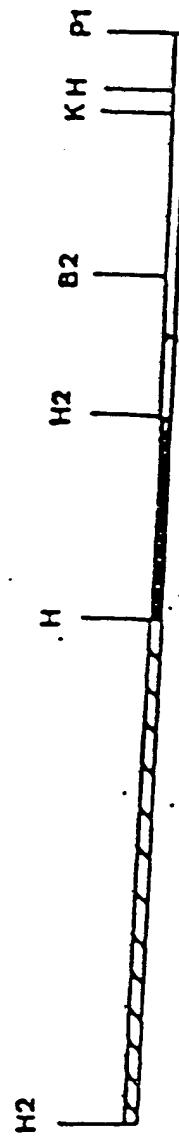
Sonde 3



4/5

FIGURE 4

pHT 671



ADN du vecteur pUC9

ADN de la souche entomocidus 601

ADN de la souche azizawai 7-29

B2 : Bgl II

H : Hind III

H2 : Hinc II

K : Kpn I

P1 : Pst I

1 Kb

5/5

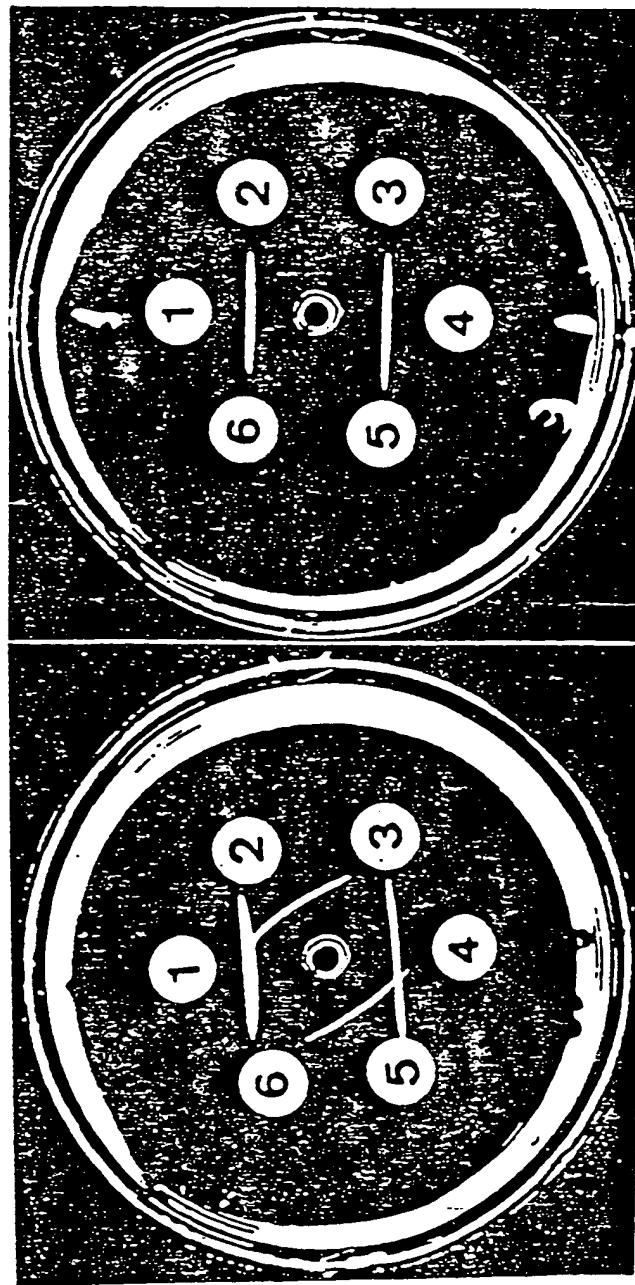


Figure 5

B

A